

**ALISSON FERNANDES DOS SANTOS**

**AÇÃO DE DESFEROXAMINA E DEFERIPRONA EM ERITRÓCITOS DE  
PORTADORES DE  $\beta$ -TALASSEMIAS SUBMETIDOS À SOBRECARGA  
OXIDATIVA DE *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO, *IN VITRO***

**CURITIBA  
2008**

**ALISSON FERNANDES DOS SANTOS**

**AÇÃO DE DESFEROXAMINA E DEFERIPRONA EM ERITRÓCITOS DE  
PORTADORES DE  $\beta$ -TALASSEMIAS SUBMETIDOS À SOBRECARGA  
OXIDATIVA DE *terc*-BUTILHIDROPERÓXIDO, *IN VITRO***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profª Drª Maria Suely Soares Leonart

Co-orientador: Prof. Dr. Aguinaldo J. do Nascimento

**CURITIBA  
2008**

*Para a minha querida e adorável esposa Aline,  
a minha filhinha queridinha Sofia,  
aos meus pais e irmãos.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me ter dado coragem e força para enfrentar os obstáculos e ensinado que nada é impossível para ser um exemplo de vida.

A minha esposa Aline, pela paciência e compreensão durante minha ausência. Pelo amor e conforto eternos que são só meus e os terei para sempre. Pelas palavras positivas e contagiosas para chegar ao final do mestrado mostrando que não sou diferente de ninguém. Obrigado adorável esposa!!!

A minha filha Sofia, por ter chegado no meio do mestrado e me felicitado, dando coragem, alegria e amenizando as dificuldades encontradas no período da pesquisa.

Aos meus pais, Antonio e Cida, primeiros contatos de vida, que confiaram em mim e mostraram que os obstáculos fazem parte da batalha. Em especial a minha mãe que nunca deixou de lutar e sempre manteve a esperança em ver o sucesso dos filhos. Obrigado mãe!!!!

A minha irmã Alessandra, minha grande amiga de infância... muitas brincadeiras e briguinhas também. Ao meu irmão temporão, Victor, que trouxe mais alegria à família tornando-a mais jovial. Também pela sua companhia a Aline e a Sofia nos fins-de-semana em que estive trabalhando na UFPR.

A minha sogra Elza, pela paciência durante suas visitas, onde muitas vezes tive que me ausentar para me dedicar à pesquisa.

À minha orientadora Professora Maria Suely, por ter me aceito como seu orientado; pela amizade, apoio e conhecimentos espetaculares para a conclusão do trabalho. Além das horas de sono perdido em que se dedicou a minha pesquisa.

Ao meu co-orientador Professor Aguinaldo José do Nascimento, gênio da informática, pela ajuda na estatística, amizade e apoio. E, é claro, pelos deliciosos almoços ofertados em sua casa...

À grande amiga Irene Ermelino Santos, funcionária do Laboratório de Citologia Clínica, pela ajuda e paciência em lavar a montanha de vidrarias.

Aos amigos do laboratório de Citologia, em especial, ao Fagner, pela solução das dúvidas encontradas nas técnicas.

Aos amigos do Mestrado em Ciências Farmacêuticas, pela ajuda e força no período das aulas.

Ao professor Geraldo Picheth, meu orientador da Especialização em Microbiologia Clínica pela UFPR, pela liberação do uso do espectrofotômetro do setor de Bioquímica Clínica.

À Maria da Graça Toledo pela simpatia e ensinamentos no manuseio do espectrofotômetro.

À secretária Regina Montrezol, pela competência e informações valiosas durante a realização do curso.

Aos indivíduos portadores de talassemias e seus familiares pela permissão na coleta de sangue, material precioso para elaboração da pesquisa e por contribuírem para a evolução do conhecimento da Ciência.

Ao Dr. Giorgio Baldanzi, médico hematologista do HEMEPAR, pela permissão da coleta de sangue dos indivíduos talassêmicos. Aos funcionários da coleta, Italomar e Irani, pela colaboração.

A todos os doadores voluntários que contribuíram com a pesquisa.

Aos meus companheiros de trabalho, em especial, Maria do Pilar, Mônica Silveira, Kátia Boritza e Júlio César Machado, e todos os outros amigos que de certa forma contribuíram para a dissertação, dando força e apoio.

“Nunca, jamais desanimeis, embora venham ventos contrários!”  
*Madre Paulina*

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>                                      |           |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>                                       |           |
| <b>LISTA DE QUADROS .....</b>                                      |           |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>                         |           |
| <b>RESUMO.....</b>   |           |
| <b>ABSTRACT .....</b>  |           |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                               | <b>19</b> |
| 2.1 Eritrócito humano .....  | 19        |
| 2.2 Membrana eritrocitária .....                                   | 19        |
| 2.3 Hemoglobina .....  | 20        |
| 2.4 Metabolismo de ferro .....                                     | 22        |
| 2.5 Metabolismo eritrocitário .....                                | 23        |
| 2.5.1 Metabolismo oxidativo dos eritrócitos e hemólise .....       | 26        |
| 2.6 Sistema antioxidante do eritrócito .....                       | 30        |
| 2.7 Doenças hemolíticas .....                                      | 32        |
| 2.7.1 Anemia falciforme .....                                      | 33        |
| 2.7.2 Deficiência de Glicose-6 fosfato desidrogenase (G6-PD) ..... | 33        |
| 2.7.3 Talassemias .....  | 34        |
| 2.7.3.1 $\alpha$ -talassemia .....                                 | 34        |
| 2.7.3.2 $\beta$ -talassemia .....                                  | 36        |
| 2.7.3.3 $\delta\beta$ -talassemia .....                            | 40        |
| 2.7.3.4 $\gamma\delta\beta$ -talassemia .....                      | 40        |
| 2.7.3.5 Talassemias e transfusão sanguínea .....                   | 40        |
| 2.8 Desferoxamina .....  | 41        |
| 2.9 Deferiprona .....  | 42        |
| 2.10 Desferoxamina x Deferiprona .....                             | 43        |
| 2.11 Agente oxidante: <i>terc</i> - butilhidroperóxido .....       | 45        |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>   | <b>47</b> |
| 3.1 Objetivo principal .....                                       | 47        |
| 3.2 Objetivos secundários .....                                    | 47        |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                 | <b>48</b> |
| 4.1 Material .....   | 48        |

|   |     |
|---|-----|
| 4.2 Métodos .....   | 48  |
| 4.2.1 Coleta de material .....  | 48  |
| 4.2.2 Descrição das técnicas envolvidas.....  | 49  |
| 4.2.2.1 Isolamento e lavagem de eritrócitos.....  | 49  |
| 4.2.2.2 Tratamento das amostras com quelantes de ferro .....  | 49  |
| 4.2.2.2.1 Tratamento de amostras com substâncias quelantes de ferro .....   | 49  |
| 4.2.2.2.1.1 Incubação de eritrócitos com desferoxamina .....  | 49  |
| 4.2.2.2.1.2 Incubação de eritrócitos com deferiprona .....  | 50  |
| 4.2.2.2.1.3 Incubação de eritrócitos com desferoxamina e deferiprona .....  | 50  |
| 4.2.2.3 Tratamento das amostras controle com substância oxidante <i>tert</i> -<br>butilhidroperóxido (TBHP) ..... | 50  |
| 4.2.2.3.1 Tratamento de amostras com desferoxamina.....   | 50  |
| 4.2.2.3.2 Tratamento de amostras com deferiprona.....   | 51  |
| 4.2.2.3.3 Tratamento de amostras com desferoxamina e deferiprona .....  | 51  |
| 4.2.2.4 Contagem de corpos de Heinz .....   | 51  |
| 4.2.2.5 Determinação da concentração da metahemoglobina .....   | 52  |
| 4.2.2.6 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH) .....  | 53  |
| 4.2.2.6.1 Preparo do hemolisado .....   | 53  |
| 4.2.2.6.2 Dosagem da concentração de hemoglobina .....  | 53  |
| 4.2.2.6.3 Dosagem da concentração de GSH .....  | 54  |
| 4.2.2.7 Determinação das porcentagens de hemólise .....   | 55  |
| 4.2.2.8 Determinação da atividade de enzimas do sistema antioxidante<br>eritrocitário .....                       | 56  |
| 4.2.2.8.1 Preparo de hemolisado .....   | 56  |
| 4.2.2.8.2 Dosagem da hemoglobina do hemolisado .....  | 56  |
| 4.2.2.8.3 Determinação da atividade enzimática de glicose 6-fosfato<br>desidrogenase (G6-PD) .....                | 56  |
| 4.2.2.8.4 Determinação de atividade enzimática de glutathiona redutase (GR) ....                                  | 57  |
| 4.3 Análise estatística dos resultados obtidos .....  | 58  |
| <b>5. RESULTADOS</b> .....  | 59  |
| <b>6. DISCUSSÃO</b> .....   | 90  |
| <b>7. CONCLUSÃO</b> .....   | 102 |
| <b>8. REFERÊNCIAS</b> .....   | 104 |
| <b>ANEXOS</b> .....   | 111 |



## LISTA DE FIGURAS

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| FIGURA 1 –  | HEME: GRUPO PROSTÉTICO DA HEMOGLOBINA.....   | 21 |
| FIGURA 2 –  | ESQUEMA DA GLICÓLISE, DO CICLO DAS PENTOSE E DO CICLO DE LUEBERING-RAPOPORT EM ERITRÓCITOS HUMANOS .....   | 25 |
| FIGURA 3 –  | SEQÜÊNCIA DE PROCESSOS OXIDATIVOS NO ERITRÓCITO .....  | 29 |
| FIGURA 4 –  | SISTEMA ANTIOXIDANTE DOS ERITRÓCITOS .....   | 32 |
| FIGURA 5 –  | DESFEROXAMINA .....  | 42 |
| FIGURA 6 –  | DEFERIPRONA .....  | 43 |
| FIGURA 7 –  | ESQUEMA DE TERAPIA COMBINADA COM DESFEROXAMINA E DEFERIPRONA E SUA AÇÃO FARMACOLÓGICA .....  | 45 |
| FIGURA 8 –  | <i>Terc</i> -BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) .....   | 46 |
| FIGURA 9 –  | FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE TBHP .....  | 59 |
| FIGURA 10 – | FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E POSTERIORMENTE SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP .....      | 60 |
| FIGURA 11 – | FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM L1 E POSTERIORMENTE SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP .....       | 61 |
| FIGURA 12 – | FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E L1 E POSTERIORMENTE SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP ..... | 62 |
| FIGURA 13 – | CONCENTRAÇÃO DE GSH NOS ERITRÓCITOS NORMAIS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO OXIDANTE DE 1 A 5 mmoles/l DE TBHP .....                                    | 63 |
| FIGURA 14 – | CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E SUBMETIDOS POSTERIORMENTE À OXIDAÇÃO POR TBHP .....                                    | 64 |
| FIGURA 15 – | CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM L1 E POSTERIORMENTE SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP .....               | 65 |
| FIGURA 16 – | CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E L1 E POSTERIORMENTE SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP .....         | 66 |
| FIGURA 17 – | FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE TBHP .....  | 67 |
| FIGURA 18 – | FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM L1 E POSTERIORMENTE SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP .....       | 68 |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| FIGURA 19 – | PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE TBHP .....  | 69 |
| FIGURA 20 – | PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E POSTERIORMENTE SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP .....  | 70 |
| FIGURA 21 – | PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM L1 POSTERIORMENTE SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP .....   | 71 |
| FIGURA 22 – | PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E L1 E POSTERIORMENTE SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE DE 3 mmoles/l DE TBHP .....  | 72 |
| FIGURA 23 – | ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE G6-PD EM ERITRÓCITOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE DE TBHP..   | 73 |
| FIGURA 24 – | ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE G6-PD EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM 1, 2 E 4 mmoles/l DE DFX E OXIDADOS COM 5 mmoles/l DE TBHP.....  | 74 |
| FIGURA 25 – | ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE G6-PD EM ERITRÓCITOS TRATADOS COM 3, 6, 9 E 12 mmoles/l DE L1 E OXIDADOS COM 5 mmoles/l DE TBHP.....   | 75 |
| FIGURA 26 – | DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE GR EM ERITRÓCITOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE DE TBHP .....   | 76 |
| FIGURA 27 – | ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE GR EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM 1, 2 E 4 mmoles/l DE DFX E OXIDADOS COM 5 mmoles/l DE TBHP .....  | 77 |
| FIGURA 28 – | ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE GR EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM 3, 6, 9 E 12 mmoles/l DE L1 E OXIDADOS COM 5 mmoles/l DE TBHP .....   | 78 |
| FIGURA 29 – | FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS PORTADORES DE $\beta$ -TALASSEMIA MENOR SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE TBHP .....  | 79 |
| FIGURA 30 – | CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS DE PORTADORES DE $\beta$ -TALASSEMIA MENOR SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM DFX (4 mmoles/l); L1 (12 mmoles/l) E DFX/L1 (4 mmoles/l / 12 mmoles/l) E, POSTERIORMENTE, SUBMETIDOS AO OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP ..... | 80 |
| FIGURA 31 – | FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE $\beta$ -TALASSEMIA MENOR SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP .....   | 81 |
| FIGURA 32 – | PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS DE PORTADORES DE $\beta$ -TALASSEMIA MENOR SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE DE 3 mmoles/l DE TBHP .....  | 82 |
| FIGURA 33–  | FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS DE PACIENTES PORTADORES DE $\beta$ -TALASSEMIA MAIOR, SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP .....  | 83 |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| FIGURA 34 – | CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS DE PACIENTES PORTADORES DE $\beta$ -TALASSEMIA MAIOR, SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP .....       | 84 |
| FIGURA 35 – | FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM AMOSTRAS DE PACIENTES PORTADORES DE $\beta$ -TALASSEMIA MAIOR SUBMETIDAS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP .....   | 85 |
| FIGURA 36 – | PORCENTAGEM DE HEMÓLISE DOS ERITRÓCITOS DE PACIENTES DE $\beta$ -TALASSEMIA MAIOR SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP .....              | 86 |
| FIGURA 37 – | ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE G6-PD EM ERITRÓCITOS DE PACIENTES PORTADORES DE $\beta$ -TALASSEMIAS SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 5 mmoles/l DE TBHP ..... | 87 |
| FIGURA 38 – | ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE GR EM ERITRÓCITOS DE PACIENTES PORTADORES DE $\beta$ -TALASSEMIAS SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 5 mmoles/l DE TBHP .....    | 88 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| TABELA 1 – HEMOGLOBINAS NORMAIS EM RECÉM-NASCIDOS E ADULTOS .....  | 21 |
| TABELA 2 – AÇÃO PRÓ-OXIDANTE DO TBHP E ANTIOXIDANTE DA DESFEROXAMINA E DEFERIPRONA EM ERITRÓCITOS NORMAIS E DE PORTADORES DE $\beta$ -TALASSEMIA MENOR E $\beta$ -TALASSEMIA MAIOR ..... | 89 |

## LISTA DE QUADROS

|   |    |
|---|----|
| QUADRO 1 - SÍNDROMES $\alpha$ -TALASSÊMICAS ..... | 35 |
| QUADRO 2 – SÍNDROMES $\beta$ -TALASSÊMICAS .....  | 39 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                               |   |   |
|-------------------------------|---|---|
| ADP                           | – | Adenosina difosfato                         |
| ATP                           | – | Adenosina trifosfato                        |
| 2,3-BPG                       | – | 2,3-bifosfoglicerato                        |
| CPD-A                         | – | Citrato-fosfato-dextrose-adenina            |
| DTNB                          | – | Acido 2-nitrobenzóico                       |
| DFX                           | – | Desferoxamina                               |
| DNA                           | – | Ácido desoxirribonucleico                   |
| EDTA                          | – | Etilenodiaminotetracetato                   |
| EDTA K <sub>3</sub>           | – | Etilenoaminotetracetato trissódico          |
| FAD                           | – | Flavina adenina dinucleotídeo               |
| FADH <sub>2</sub>             | – | Flavina adenina dinucleotídeo reduzido      |
| Fe <sup>+2</sup>              | – | Íon ferroso                                 |
| Fe <sup>+3</sup>              | – | Íon férrico                                 |
| G6-PD                         | – | Glicose 6-Fosfato desidrogenase             |
| GSH                           | – | Glutathiona reduzida                        |
| GSH-Px                        | – | Glutathiona Peroxidase                      |
| GSSG                          | – | Glutathiona oxidada                         |
| GR                            | – | Glutathiona Redutase                        |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | – | Peróxido de Hidrogênio                      |
| Hb                            | – | Hemoglobina                                 |
| HCM                           | – | Hemoglobina corpuscular média               |
| Ht                            | – | Hematócrito                                 |
| kDa                           | – | quilodaltons                                |
| LH                            | – | Cadeia poliinsaturada                       |
| L <sup>·</sup>                | – | Radical da cadeia poliinsaturada            |
| LOO <sup>·</sup>              | – | Radical da cadeia lipídios hidroperóxido    |
| metHb                         | – | Metahemoglobina                             |
| mmol/l                        | – | Milimol por litro                           |
| nm                            | – | Nanômetro                                   |
| NADH                          | – | Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido |

|         |   |
|---------|---|
| NADPH   | – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido |
| NTBI    | – Ferro não ligado a transferrina                     |
| $O_2^-$ | – Radical superóxido                                  |
| $OH^-$  | – Radical hidroxila                                   |
| Oxi-Hb  | – Oxihemoglobina                                      |
| pH      | – Potencial Hidrogeniônico                            |
| SOD     | – Superóxido dismutase                                |
| VCM     | – Volume corpuscular médio                            |

## RESUMO

O ferro, apesar de ser vital para o organismo humano, é prejudicial quando apresenta níveis altos, devido seu papel na geração de radicais livres. Os eritrócitos de pacientes portadores de hemoglobinopatias, como as talassemias, apresentam estresse oxidativo devido à deficiência na formação de hemoglobina e à presença do ferro livre, que contribuem para a lipoperoxidação da membrana e hemólise. Em  $\beta$ -talassemia maior, os pacientes necessitam de constantes transfusões de sangue para a substituição dos eritrócitos perdidos por hemólise. Como consequência, elevam-se os depósitos de ferro no coração e fígado, o que aumenta o risco de falhas destes órgãos. O tratamento com quelantes de ferro é importante para a melhoria da qualidade de vida destes indivíduos por retardar o estresse oxidativo. O objetivo deste trabalho foi o estudo “*in vitro*” da ação de desferoxamina (DFX) e deferiprona (L1) no metabolismo oxidativo de eritrócitos de pacientes com  $\beta$ -talassemia, submetidos à sobrecarga oxidativa com *tert*-butilhidroperóxido. Amostras de sangue venoso de 21 indivíduos, com idades entre 16 e 41 anos, foram coletadas em CPDA2, com consentimento informado e aprovação pelo Comitê de Ética para Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do Setor Saúde da Universidade Federal do Paraná. O Grupo A consistiu de 10 pacientes com  $\beta$ -talassemia maior, atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR). Entre eles, 3 eram tratados regularmente com 40 mg/kg/dia de DFX, e 7 tratados com 40 mg/kg/dia de DFX e 75 mg/kg/dia de L1; O Grupo B, consistiu de 5 indivíduos portadores de  $\beta$ -talassemia menor, membros familiares dos pacientes do Grupo A; O Grupo C, com 6 indivíduos considerados normais, foi usado como grupo controle. Os eritrócitos foram então tratados com o pró-oxidante TBHP, após incubação com L1 e ou DFX, no mesmo meio. Foram determinadas as concentrações de metahemoglobina (metHb); glutathiona reduzida (GSH); índices de hemólise e as atividades enzimáticas de G6-PD e GR. Observou-se níveis de metHb baixos nos eritrócitos de indivíduos normais e de talassêmicos, mas estes apresentaram hemólise e formação de corpos de Heinz. O tratamento com TBHP produziu maior concentração de metHb em  $\beta$ -talassêmicos. A DFX possui alta eficiência na proteção contra a formação de metHb nos eritrócitos normais e um efeito menor nos de  $\beta$ -talassêmicos menor. Nenhum efeito foi observado com o uso da L1. Os níveis de GSH foram maiores nos eritrócitos de indivíduos com  $\beta$ -talassemia maior do que nos normais e de  $\beta$ -talassemia menor. O efeito do TBHP em extinguir o GSH foi menor na presença de L1 e DFX em  $\beta$ -talassêmicos e normais. Ocorreram índices de hemólise mais altos nos eritrócitos de pacientes com  $\beta$ -talassemia maior do que nos normais e com  $\beta$ -talassemia menor. O TBHP causou mais hemólise em eritrócitos de  $\beta$ -talassêmicos maior, do que em  $\beta$ -talassêmicos menor e nestes mais do que em indivíduos normais, não protegida por DFX ou L1. Os índices de oxidação analisados foram maiores e o TBHP causou mais oxidação nos eritrócitos de talassêmicos do que nos normais. A DFX protegeu contra a formação de metHb em indivíduos normais e com  $\beta$ -talassemia menor. A L1 e a DFX ajudaram na manutenção dos níveis de GSH em indivíduos normais e talassêmicos. A atividade da G6-PD é mais alta em eritrócitos de indivíduos com  $\beta$ -talassemia menor que com  $\beta$ -talassemia maior. A ação pró-oxidativa do TBHP resulta em menor atividade da enzima nos eritrócitos desses indivíduos, mesmo com a utilização de DFX e L1. As atividades de GR não foram afetadas.



## ABSTRACT

The iron, in spite of being vital for the human organism, is harmful when present at high levels, due to its role in free radical generations. The patients with hemoglobinopathias, such as thalassemias, present an increase of the erythrocyte oxidative stresses, due to the deficiency in the hemoglobin formation and free iron, which contribute to the membrane lipoperoxidation and hemolysis. In  $\beta$ -thalassemia major, the patients need constant blood transfusions for the replacement of erythrocytes lost by hemolysis. As consequence, it elevates the heart and hepatic deposits of iron increasing the risk of failure of these organs. The treatment with iron chelators has been important for the improvement of the life quality of these individuals for delaying the oxidative stress processes. The aim of this work was the study on the action of deferoxamine (DFX) and deferiprone (L1) on the oxidative metabolism of erythrocytes from  $\beta$ -thalassemic patients, *in vitro*, under the pro-oxidative action of TBHP. Venous blood samples of 21 individuals, with ages between 16 and 41 years, was collected in CPDA2, after informed consent and approval given by the Ethical Committee for Research Involving Human, Setor de Saúde of the Universidade Federal do Paraná. Group A had 10 patients with  $\beta$ -thalassemia major assisted at Hematology and Hemotherapy Center of Paraná (HEMEPAR). From them, 3 was regularly treated with 40 mg/kg/day of DFX, and 7 treated with 40 mg/kg/day of DFX and 75 mg/kg/day of L1; Group B, had 5 individuals with  $\beta$ -thalassemia minor, being family members of the patients from Group A; Group C, with 6 individuals considered normal, as control group. Erythrocytes were then treated with the pro-oxidizer TBHP, after incubation with L1 and or DFX, in the same medium. It were determined the methemoglobine (metHb) concentrations; reduced glutathione (GSH); hemolysis indexes; and enzyme activities of G6-PD and GR. Levels of metHb are low in the erythrocytes of normal and  $\beta$ -thalassemic individuals, but the  $\beta$ -thalassemics showed hemolysis and Heinz bodies formation. The treatment with TBHP produces larger concentration of metHb in  $\beta$ -thalassemics. The DFX possesses high efficiency for protection against metHb formation in normal individuals and a smaller effect in the  $\beta$ -thalassemic minor. This effect was not shown when L1 was used. The levels of GSH are larger in the erythrocytes of  $\beta$ -thalassemic major individuals than in normal and  $\beta$ -thalassemic minor ones. The effect of the TBHP causes smaller loss of GSH in the  $\beta$ -thalassemic major individuals than in the normal and  $\beta$ -thalassemics minor individuals. The effect of the TBHP in extinguishing GSH is smaller in the presence of L1 and DFX in  $\beta$ -thalassemic and normal individuals. There is higher hemolysis indexes in the erythrocytes of  $\beta$ -thalassemic major individuals than in the normal and  $\beta$ -thalassemic minor ones. The TBHP causes larger hemolysis in the  $\beta$ -thalassemic major and minor (major > minor) individuals then in normal ones. The L1 and DFX does not protect against the hemolysis. The analyzed oxidation indexes are larger in the erythrocytes of  $\beta$ -thalassemic individuals then in the normal ones. The TBHP causes larger oxidation in the  $\beta$ -thalassemic individuals than in the normal ones. The DFX protects against the formation of metHb in normal and  $\beta$ -thalassemic minor individuals. The L1 and DFX aid in the maintenance of the levels of GSH in normal and  $\beta$ -thalassemic individuals. The activity of G6-PD is higher in erythrocytes from individuals with  $\beta$ -thalassemia minor than with  $\beta$ -thalassemia minor. The pro-oxidative action of TBHP results in smaller activity of the enzyme, even with the use of DFX and L1. The activities of GR were not affected.

## 1. INTRODUÇÃO

O ferro é essencial para todos os organismos, onde participa em vários processos metabólicos, tais como o transporte de oxigênio na forma de hemoglobina nos eritrócitos, síntese de DNA e transporte de elétrons (PAPANIKOLAOU & PANTOPOULOS, 2005). Porém, em quantidades maiores, é prejudicial à saúde pela geração de radicais livres, que podem iniciar a peroxidação dos lipídios da membrana, bem como agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (GUTTERIDGE et al., 1982).

Os portadores de doenças hemolíticas como  $\beta$ -talassemia maior, anemia falciforme e deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase, apresentam sobrecarga de ferro sanguíneo, proveniente de freqüentes transfusões. Cada mililitro de células vermelhas transfundidas contém aproximadamente 1 mg de ferro (PAPANIKOLAOU & PANTOPOULOS, 2005). No caso das talassemias, existe ainda um acúmulo de ferro adicional, devido a deficiências de produção de cadeias protéicas normais da hemoglobina (LEE et al., 1999). O excesso de ferro no sangue é depositado no sistema hepático e/ou cardíaco ocasionando dano funcional ao órgão (FABRON & TRICTA, 2003).

Segundo COHEN et al. (2004), o emprego terapêutico de quelantes de ferro tem por objetivo diminuir a quantidade deste metal no sangue a níveis seguros, evitando assim complicações no organismo. As propriedades ideais de um quelante para uso terapêutico são: especificidade e afinidade por  $\text{Fe}^{+3}$ ; eficiência da ação quelante; facilidade de penetração nas células e tecidos; não redistribuição do ferro; toxicidade relativamente baixa; baixo custo e viabilidade pela administração oral.

O presente trabalho tem o intuito de analisar a ação de desferoxamina e deferiprona sobre eritrócitos *in vitro*, visando um aprofundamento no estudo da utilidade terapêutica destes medicamentos, em especial no tratamento de pacientes talassêmicos. A sua importância é reforçada devido ao reduzido número de trabalhos sobre o efeito de quelantes de ferro em eritrócitos *in vitro*, que podem auxiliar no esclarecimento dos mecanismos pelos quais este tipo de tratamento pode ser eficiente.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Eritrócito humano

O eritrócito humano possui forma de disco bicôncavo, elevada flexibilidade e pode atravessar pequenos vasos e capilares, mantendo-se íntegro. O formato da célula é mantido por uma variedade de condições, incluindo força elástica entre a membrana superficial, pressão osmótica e a presença de proteínas poliméricas (SIMMONS, 1997).

O eritrócito humano, em condições normais, permanece na circulação por cerca de 120 dias (DACIE & LEWIS, 1995). É um elemento vital ao funcionamento do metabolismo aeróbico dos tecidos, realizando o transporte de oxigênio através da hemoglobina. O eritrócito, através de seu metabolismo ativo, mantém o equilíbrio fisiológico, protegendo a hemoglobina de agentes oxidantes e fazendo-a voltar ao normal quando alterada (NAOUM, 1997; TELEN & KAUFMAN, 1998).

Em quaisquer circunstâncias que alterem o meio, como variação osmótica e de pH, podem ocorrer alterações na forma dos eritrócitos. Por exemplo, equinócitos são formados quando há diminuição do ATP intracelular e aumento do cálcio; e estomatócitos, em situações de redução do pH e na presença de detergentes catiônicos (SIMMONS, 1997).

No citosol dos eritrócitos, a hemoglobina se encontra em maior concentração, bem como as enzimas necessárias para produção de energia e manutenção da hemoglobina em seu estado funcional, ou seja, na forma reduzida. Por não apresentar as organelas citoplasmáticas, como núcleo, mitocôndria e ribossomos, o eritrócito é incapaz de sintetizar novas proteínas, realizar reações oxidativas associadas com mitocôndrias ou sofrer mitose. No entanto, constitui um complexo funcional importante no corpo humano (TELEN & KAUFMAN, 1998).

### 2.2 Membrana eritrocitária

A membrana eritrocitária é constituída por uma bicamada lipídica com 41% de lipídios, 52% de proteínas e 7% de carboidratos (HARRIS, 1991). Os lipídios são

constituídos, principalmente, de colesterol não esterificado e fosfolípidios, em concentrações equimoleculares. Os fosfolípidios constituem a bicamada lipídica, com sua porção polar hidrofílica, interagindo com o ambiente aquoso dos meios intra e extracelular, enquanto a cadeia apolar, hidrofóbica, é voltada para o interior da membrana (ALBERTS et al., 1999).

A membrana eritrocitária possui grande variedade de proteínas, que podem ser classificadas em dois grandes grupos: as integrais ou intrínsecas e as periféricas ou extrínsecas. As proteínas integrais estão firmemente associadas aos lipídios e só podem ser separadas da fração lipídica através do emprego de detergentes. As proteínas extrínsecas podem ser isoladas facilmente, bastando reduzir a concentração iônica da solução aquosa de extração (HANDIN et al., 1995).

As proteínas periféricas são representadas pelas espectrinas, anquirinas, bandas 4.1, 4.2, 4.9, 5, aducina, bandas 6 e 7. A interação dessas proteínas do citoesqueleto com a bicamada lipídica e com as proteínas integrais da membrana é responsável pela flexibilidade e deformabilidade do eritrócito. As proteínas integrais, representadas pela banda 3, glicoforinas e banda 4.5, possuem funções variadas, entre elas, transporte iônico e ancoragem da membrana ao citoesqueleto, além de apresentarem sítios para a ligação de antígenos, enzimas e hemoglobina (HANDIN et al., 1995).

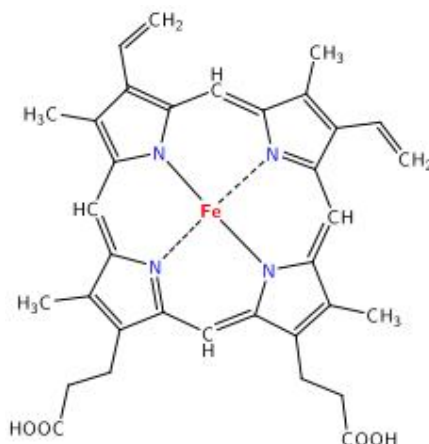
### 2.3 Hemoglobina

A hemoglobina é uma proteína transportadora de oxigênio e constitui 95% das proteínas presentes no citosol dos eritrócitos (LEE et al., 1999). Possui peso molecular de 64,5 kDa e uma molécula esférica com o diâmetro molecular máximo de 6,4 nm. É um tetrâmero, consistindo de dois pares de cadeias polipeptídicas, sendo um par de cadeias globina  $\alpha$  e outro par, de cadeias  $\beta$ ,  $\gamma$  ou  $\delta$ , de acordo com o tipo de hemoglobina (SIMMONS, 1997). As cadeias são interligadas a grupos prostéticos heme, os quais se constituem de um complexo de ferro e protoporfirina, composta por 4 anéis pirrólicos. A porção protéica da molécula é chamada de globina (TELEN & KAUFMAN, 1998; STRYER, 1999).

O átomo de ferro do heme liga-se aos quatro nitrogênios no centro do anel porfirínico. O ferro pode apresentar dois estados de oxidação: ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) ou

férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ), mas pode ligar-se ao oxigênio somente no estado ferroso (STRYER, 1999).

FIGURA 1 – HEME: GRUPO PROSTÉTICO DA HEMOGLOBINA



Fonte: [www.tiosam.com/enciclopedia/?q=Porfiria](http://www.tiosam.com/enciclopedia/?q=Porfiria) (acessado em 03/01/08).

Nos adultos normais, há duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$ , formando a hemoglobina A (Hb A), que constitui cerca de 97% da hemoglobina total; duas cadeias  $\alpha$  e duas  $\delta$  para a hemoglobina A<sub>2</sub> (Hb A<sub>2</sub>), que representa até 3% da hemoglobina, e duas cadeias  $\alpha$  e duas  $\gamma$  para a hemoglobina fetal (Hb F), que pode representar até 1% de hemoglobina total. A Tabela 1 mostra a proporção das hemoglobinas presentes em recém-nascidos e adultos. De acordo com as fases da vida fetal, existem proporções variáveis da Hb F e das hemoglobinas Portland, Gower I e Gower II (TELEN & KAUFMAN, 1998).

TABELA 1 - HEMOGLOBINAS NORMAIS EM RECÉM-NASCIDOS E ADULTOS

| Hemoglobina    | Estrutura Molecular     | Proporção (%) |                |
|----------------|-------------------------|---------------|----------------|
|                |                         | Adultos       | Recém Nascidos |
| A              | $\alpha_2\beta_2$       | 97            | 20             |
| A <sub>2</sub> | $\alpha_2\delta_2$      | 3             | 0,5            |
| F              | $\alpha_2\gamma_2$      | <1            | 80             |
| Portland       | $\zeta_2\gamma_2$       | 0             | 0              |
| Gower I        | $\zeta_2\varepsilon_2$  | 0             | 0              |
| Gower II       | $\alpha_2\varepsilon_2$ | 0             | 0              |

Fonte: Telen & Kaufman (1998)

## 2.4 Metabolismo do ferro

O ferro, metal de transição mais abundante no nosso organismo, é um elemento essencial para a utilização do oxigênio, permitindo seu transporte e participação em numerosos processos bioquímicos (PUNTAROLO, 2005).

Os estados de oxidação comuns são ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) ou férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ). O ferro tem afinidade por átomos eletronegativos, como oxigênio, nitrogênio e enxofre, que fornecem os elétrons necessários para formação das suas ligações. Em soluções aquosas de pH neutro e alcalino, o potencial redox para o ferro favorece o estado  $\text{Fe}^{+3}$ ; e, em pH ácido, o equilíbrio favorece o estado  $\text{Fe}^{+2}$  (DEVLIN, 2003).

Um indivíduo saudável de 70 kg contém aproximadamente 3 a 4 g de ferro no organismo, o que equivale a cerca de 35 a 45 mg de ferro por quilograma do peso corporal (WEINBERG, 1990; EMERIT et al., 2001). Os maiores sítios de reserva do ferro são o fígado (cerca de um terço), o baço e a medula óssea (PUNTAROLO, 2005). Aproximadamente 80% do conteúdo do ferro corporal está incorporado na hemoglobina; cerca de 10 a 15% está presente nas células musculares, na mioglobina, e em outros tecidos, em citocromos e enzimas (EMERIT et al., 2001).

Além da dieta nutricional excessiva, existem outros fatores que causam aumento do ferro no sangue, entre os quais se destacam a absorção aumentada na via intestinal, característica nos pacientes com hemocromatose hereditária; infusão de ferro parenteral; inalação de ferro e redução das perdas menstruais em mulheres pré-menopausa (WEINBERG, 1990).

Outra fonte de ferro provém dos macrófagos, que fagocitam os eritrócitos senescentes, proporcionando boa proporção de reciclagem do ferro sangüíneo (DUNN et al., 2006)

O principal local da absorção do ferro proveniente da dieta é no intestino delgado, sendo que a maior quantidade é absorvida nos enterócitos duodenais, e em menor escala nas porções mais distais do intestino delgado (DEVLIN, 2003).

O ferro é transportado e estocado nas proteínas específicas que são transferrina, lactoferrina e ferritina (FERRALI et al., 1992).

A transferrina, glicoproteína monomérica de 80 kDa, é sintetizada no fígado e auxilia o transporte do ferro no sangue. É um carreador com sítios ligantes para dois íons férricos com alta afinidade ( $K_d=10^{-23}$  M em pH neutro) (PONKA et al., 1998).

A ferritina atua como “depósito” de ferro nos hepatócitos e macrófagos reticulendoteliais (EMERIT et al., 2001), sendo que pode estocar 4.500 átomos de ferro por molécula (PONKA et al., 1998) e, dessa forma, auxilia na manutenção do íon férrico, forma não tóxica (HALLYDAY et al., 1994). Este processo é essencial para acelerar a eritropoiese quando a concentração do ferro é baixa no sangue (EMERIT et al., 2001). A incorporação do ferro na ferritina é requerida pela atividade de ferroxidase (PUNTAROLO, 2005).

## 2.5 Metabolismo eritrocitário

Como os eritrócitos não possuem mitocôndria, são dependentes pelo menos de duas vias para produção de energia, a via glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas e via das pentoses fosfato ou das hexoses monofosfato ou do fosfogluconato (Figura 2). Em condições normais, o consumo da glicose nas hemácias é cerca de 90% pela via glicolítica e 10% pela via das pentoses. Em condições de estresse oxidativo, a via das hexoses monofosfato pode consumir cerca de 90% da glicose (TELEN & KAUFMAN, 1998).

Na via glicolítica ou de Embden-Meyerhof-Parnas, três produtos importantes são formados: NADH, co-fator para redução de metahemoglobina; ATP, como fonte de energia; e 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG), um regulador importante para a função da hemoglobina. Para uma molécula de glicose que entra nesta via, duas moléculas de NADH são geradas; ATP e 2,3-BPG variam, dependendo da atividade do desvio de Luebering-Rapoport, uma via exclusiva do eritrócito (TELEN & KAUFMAN, 1998).

Na via das pentoses fosfato, o produto em destaque é a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NAPDH), que é co-fator na redução de glutatona oxidada (GSSG) (TELEN & KAUFMAN, 1998).

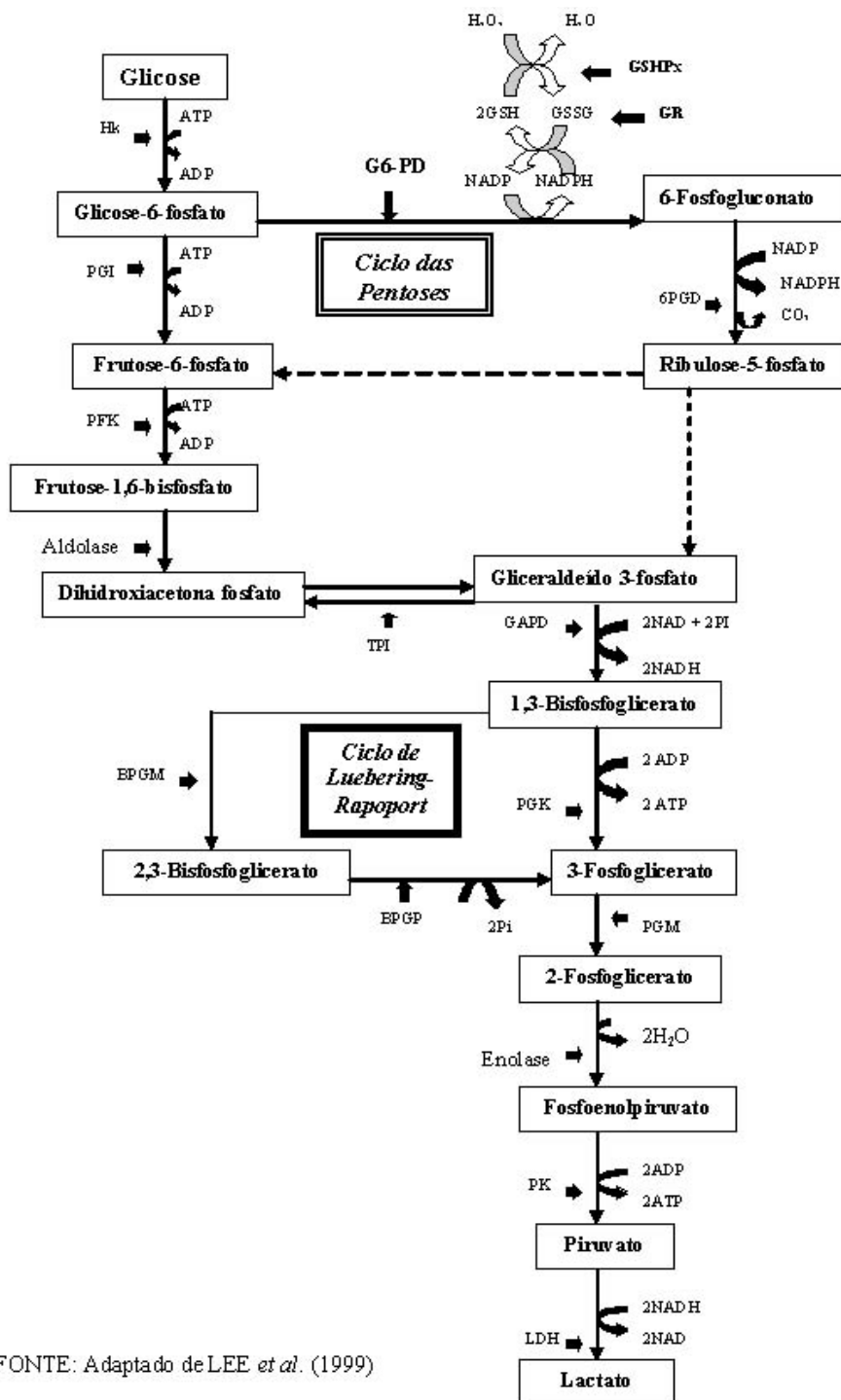
O 2,3-BPG é um fator determinante para a afinidade do oxigênio com a hemoglobina. É sintetizado na via glicolítica intermediária, conhecida como desvio de Luebering-Rapoport. Apesar de algumas etapas da via glicolítica estarem sensíveis em algumas condições, como o pH, a relação ADP-ATP e NAD-NADH e a concentração de fósforo inorgânico é que influenciam a produção de 2,3-BPG. O aumento de ADP é associado ao aumento da produção de 3-fosfoglicerato e a diminuição de 2,3-BPG. Substâncias oxidantes como azul de metileno e piruvato

aumentam a síntese de 2,3-BPG, por afetar a relação NAD-NADH (TELEN & KAUFMAN, 1998).

A função mais importante de 2,3-BPG é o efeito sobre a afinidade entre oxigênio e hemoglobina. No estado desoxigenado, a hemoglobina A pode ligar-se a 2,3-BPG na proporção molar de 1:1, reação que conduz à diminuição da afinidade ao oxigênio e melhora a liberação de oxigênio nos tecidos. O aumento da afinidade do oxigênio pela hemoglobina fetal se deve à incapacidade da Hb F em se ligar a 2,3-BPG. Quando a concentração de 2,3-BPG aumenta dentro da hemácia, a hemoglobina tem mais dificuldade em reter o  $O_2$ , ou seja, sua afinidade pelo  $O_2$  diminui, fator preponderante para a oxigenação dos tecidos (TELEN & KAUFMAN, 1998).



FIGURA 2 – ESQUEMA DA GLICÓLISE, DO CICLO DAS PENTOSE E DO CICLO DE LUEBERING-RAPOPORT EM ERITRÓCITOS HUMANOS



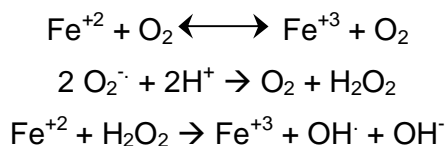
FONTE: Adaptado de LEE *et al.* (1999)

### 2.5.1 Metabolismo oxidativo dos eritrócitos e hemólise

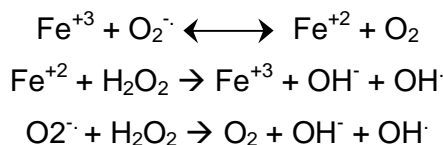
O organismo humano sofre ação constante de espécies reativas de oxigênio, geradas em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou proveniente dos alimentos. As espécies reativas de oxigênio podem ser radicalares (hidroxila, superóxido, peroxila e alcoxila); e não-radicalares (oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso) (BARREIROS et al., 2006).

O ferro é um metal que pode aceitar e doar elétrons, convertendo-se à forma férrica ( $\text{Fe}^{+3}$ ) ou ferrosa ( $\text{Fe}^{+2}$ ). O ferro pode catalisar a conversão do superóxido e peróxido de hidrogênio em radicais livres que irão atacar a membrana celular, proteínas e DNA. As reações do ferro na geração de espécies reativas são conhecidas como Reação de Fenton e Reação de Haber-Weiss, nas quais um dos produtos é o radical hidroxila (BARREIROS et al., 2006):

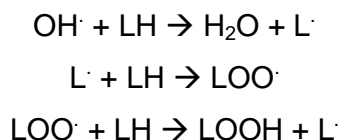
- Reação de Fenton:



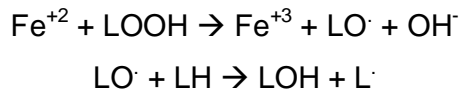
- Reação de Haber-Weiss:



O radical  $\text{OH}^\cdot$  é capaz de seqüestrar o hidrogênio da cadeia poliinsaturada (LH) iniciando a peroxidação lipídica (BARREIROS et al., 2006).



Quando há acúmulo de lipídios hidroperóxidos (LOOH), o ferro livre pode iniciar diretamente a lipoperoxidação (BARREIROS et al., 2006).



A lipoperoxidação progressiva ocasiona perda estrutural e funcional da membrana. O radical  $\text{OH}\cdot$  é altamente reativo e tem meia vida nas células, de somente  $10^{-9}$  segundos, mas pode causar danos aos lipídios, proteínas, DNA, polissacarídeos e moléculas orgânicas (NELSON & Mc CORD, 1998).

O eritrócito carrega ferro e lipídios insaturados, elementos que contribuem para a formação de espécies reativas do oxigênio, favorecendo o estresse oxidativo. As lesões do eritrócito são causadas por oxidação e desnaturação da hemoglobina, bem como por ataque de radicais livres aos lipídios e às proteínas da membrana (REVUELTA et al., 2005).

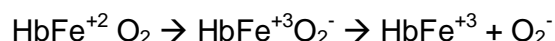
No estado de oxihemoglobina, o ferro no heme está em estado ferroso “alto spin”, com seis elétrons, sendo quatro não pareados. Quando o oxigênio é adicionado, um destes elétrons é parcialmente transferido para ligar-se ao oxigênio. Quando o oxigênio é liberado, a oxihemoglobina dissocia-se parcialmente em hemoglobina desoxigenada e uma molécula de oxigênio (TELEN & KAUFMAN, 1998):



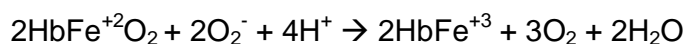
Em condições fisiológicas, a hemoglobina sofre auto-oxidação, tornando-se metahemoglobina, forma na qual o  $\text{Fe}^{+2}$  é oxidado a  $\text{Fe}^{+3}$ . Pequenas quantidades de metahemoglobina são continuamente formadas dentro das hemácias normais pela interação da hemoglobina com traços de íons superóxido. O nível de metahemoglobina de hemácias normais não é maior do que 1% da hemoglobina total, porque a metahemoglobina é rapidamente reduzida a hemoglobina, por um sistema redutor catalisado pela NADH desidrogenase. O ácido ascórbico e a glutatona podem também reduzi-la. A metahemoglobina, quando em grande concentração na circulação, por não conseguir transportar oxigênio, causa cianose (WINTERBOURN, 1990).

A oxidação pode ser acentuada em determinadas condições, como aumento da temperatura, diminuição do pH, presença de fosfato orgânico e íons de metal e oxigenação parcial de hemoglobina. Para que a ligação do oxigênio seja reversível, o ferro precisa estar na forma reduzida ( $\text{Fe}^{+2}$ ) (TELEN & KAUFMAN, 1998).

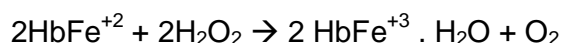
O ânion superóxido pode ser produzido pela dissociação do oxigênio, ou seja, oxidação do ferro para estado férrico, produzindo metahemoglobina (TELEN & KAUFMAN, 1998):



Por outro lado, a metahemoglobina pode ser formada *in vivo* como o resultado da exposição ao ânion superóxido (TELEN & KAUFMAN, 1998):



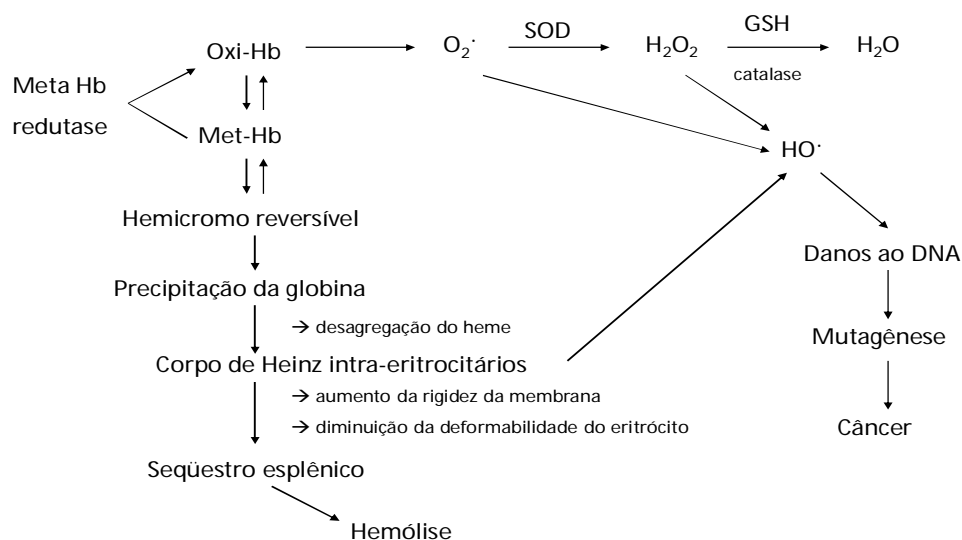
A metahemoglobina pode ainda ser resultante da reação direta da hemoglobina reduzida com a redução do produto do íon superóxido, o peróxido (TELEN & KAUFMAN, 1998):



No aumento da sobrecarga oxidativa ou diminuição das defesas antioxidantes, a produção da hemoglobina oxidada aumenta e há geração de mais espécies reativas de oxigênio. Durante a desnaturação oxidativa, a metahemoglobina forma hemicromos (Figura 3), que são os primeiros produtos de desnaturação progressiva da globina, e que, na seqüência, formam os hemicromos irreversíveis. Estes são gerados quando o heme se dissocia da globina e passa a ocupar outra posição na molécula, devido à modificação na estrutura por desnaturação das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ . Os hemicromos irreversíveis podem ainda precipitar junto com a globina e a hemina, ou seja, o grupo heme livre, formando os chamados corpos de Heinz (WINTERBOURN, 1990).

A associação dos fenômenos de lipoperoxidação, com formação de corpos de Heinz e oxidação dos grupos tióis, promove lesão da membrana do glóbulo vermelho, causando hemólise (WINTERBOURN, 1990).

FIGURA 3 – SEQÜÊNCIA DE PROCESSOS OXIDATIVOS NO ERITRÓCITO



Fonte: Naoum (1997).

A formação de inclusões citoplasmáticas é causada pelo aumento do estresse oxidativo, como resultado do aumento da produção de radicais livres do oxigênio. As cadeias globina auto-oxidadas são mais firmes que o tetrâmero natural, produzindo quebras dos produtos de hemoglobina oxidada e radicais superóxido. Isto indica que a associação entre as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , formando tetrâmeros na molécula de hemoglobina, confere um mecanismo de proteção contra os ataques dos oxidantes presentes nas células vermelhas, como o peróxido de hidrogênio e o superóxido. Esta proteção é deficiente nos pacientes talassêmicos (HARRIS, 1991).

A formação de corpos de Heinz é o resultado do estresse oxidativo pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. O aumento da susceptibilidade dos eritrócitos talassêmicos ao estresse oxidativo deve-se à modificação da composição poliinsaturada dos lipídios, que leva à lipoperoxidação nas membranas eritrocitárias, ocasionando diminuição da fluidez lipídica, diminuição de ácido aracdônico e aumento de ácido palmítico. Baixos níveis de grupos tiol livres das membranas protéicas também implicam no aumento do dano oxidativo (HARRIS, 1991).

## 2.6 Sistema antioxidante do eritrócito

O eritrócito possui um sistema de defesa antioxidante protegendo-o das espécies reativas de oxigênio e mantendo a integridade estrutural e funcional de macromoléculas constituintes da membrana eritrocitária (TAVAZZI et al., 2000).

O sistema de defesa antioxidante é constituído por glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathiona peroxidase (GSH-Px) e vitamina E (Figura 4) (FREI, 1999).

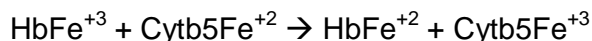
A metahemoglobina presente nos eritrócitos pode ser reduzida pela ação da enzima metahemoglobina redutase, do citocromo b5 e do NADH. Em pequenas proporções, a metahemoglobina também pode ser reduzida pela ação de glutathiona, ácido ascórbico e NADPH flavina redutase. As deficiências de citocromo b5 redutase estão associadas à metahemoglobinemia, confirmando a importância desta enzima na redução de metahemoglobina (TELEN & KAUFMAN, 1998).

O processo de redução da metahemoglobina pela enzima citocromo b5 redutase em presença de NADH ocorre em três etapas:

1ª) o NADH se liga ao complexo FAD-redutase e, na presença de íon hidrogênio, o NAD é convertido a  $\text{NAD}^+$ , e o FAD é convertido a  $\text{FADH}_2$ ;

2ª) o citocromo  $\text{b5-Fe}^{+3}$  é reduzido a citocromo  $\text{b5-Fe}^{+2}$ , e o  $\text{FADH}_2$  reverte a FAD;

3ª) a metahemoglobina forma um complexo bimolecular com o citocromo reduzido b5 pela interação eletrostática entre a carga negativa do citocromo heme e a carga positiva do heme presente da metahemoglobina:



Quando o peróxido de hidrogênio é formado, duas enzimas catalíticas na decomposição deste peróxido estão presentes nos eritrócitos. A mais importante é a glutathiona peroxidase (GSH-Px) (TELEN & KAUFMAN, 1998). Esta enzima catalisa a redução dos hidroperóxidos, levando à formação de glutathiona oxidada (GSSG) e água (VANNUCCHI et al., 1997), sendo eficaz em baixas concentrações de peróxido ( $K_m = 1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) (TELEN & KAUFMAN, 1998):

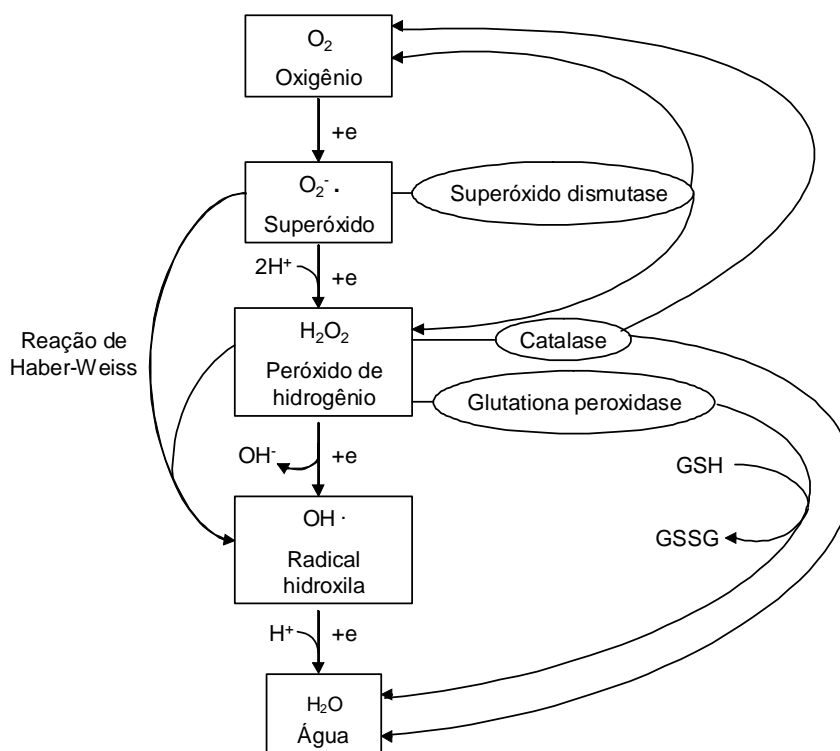


A catalase decompõe peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, mas somente se mostra eficaz em altas concentrações de peróxido (TELEN & KAUFMAN, 1998). Sua atividade é dependente de NADPH, prevenindo a oxidação de GSH mediada pelo peróxido de hidrogênio em eritrócitos normais (SCOTT et al., 1991).

A enzima superóxido dismutase, metaloenzima dependente de cobre e zinco, catalisa a dismutação do radical superóxido em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$  na presença de próton  $\text{H}^+$  (VANNUCCHI et al., 1997).

A glutathione é o principal agente redutor em eritrócitos e atua como co-fator para a reação de glutathione peroxidase. Durante a reação de proteção da oxidação da hemoglobina, GSH é oxidada, formando glutathione oxidada (GSSG), que consiste de duas moléculas de GSH unidas por uma ligação dissulfeto, e que se ligam por pontes dissulfeto à hemoglobina. A manutenção contínua de GSH requer um sistema de redução de formas oxidadas de glutathione pela ação de glutathione redutase (GR), que catalisa a redução de GSSG por NADPH, um produto presente na via das pentoses fosfato. A GR catalisa a redução da hemoglobina-glutathione dissulfeto, resultando em GSH e hemoglobina (TELEN & KAUFMAN, 1998).

FIGURA 4 - SISTEMA ANTIOXIDANTE DOS ERITRÓCITOS



Fonte: Telen & Kaufman (1998)

## 2.7 Doenças hemolíticas

As doenças hemolíticas são resultantes do aumento da destruição das células vermelhas. A anemia hemolítica se instala quando as células eritrocitárias permanecem na circulação por menos de 120 dias e a relação da destruição periférica excede a capacidade de produção dos eritrócitos, a ponto de levar a uma diminuição da concentração de hemoglobina a níveis abaixo das necessidades fisiológicas (LEE et al., 1999).

Entre as doenças hemolíticas, que mais apresentam estresse oxidativo durante a destruição precoce dos eritrócitos, estão a anemia falciforme, as



talassemias em suas formas mais graves e a deficiência de G6-PD (LEE et al., 1999).

#### 2.7.1 Anemia falciforme

A anemia falciforme decorre de uma doença hereditária causada pela mutação de ponto (GAG → GTG) no gene da globina beta da hemoglobina, originando uma hemoglobina anormal, denominada hemoglobina S (HbS), em vez da hemoglobina A (HbA). Esta mutação leva à substituição de um ácido glutâmico por uma valina na posição 6 da cadeia  $\beta$ , com conseqüente modificação físico-química na molécula da hemoglobina. Em determinadas situações, estas moléculas podem sofrer polimerização, com falcização das hemácias em condições de baixa tensão de oxigênio, ocasionando encurtamento da vida média dos glóbulos vermelhos, fenômenos de vaso-oclusão e episódios de dor e lesão de órgãos (NAOUM, 1997).

As concentrações das atividades enzimáticas antioxidantes e de coletores de radicais livres são diminuídos nos eritrócitos falcêmicos. A concentração de GSH é diminuída nos pacientes falcêmicos, o que leva à maior propensão de formar corpos de Heinz (LACHANT & TANAKA, 1986).

#### 2.7.2 Deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6-PD)

A enzima G6-PD é importante na manutenção da integridade das hemácias. Ela faz parte do ciclo das pentoses e participa da produção de NADPH, necessária em vários processos de biosíntese e também para a manutenção da atividade da catalase e da glutathione redutase (GR), essenciais na eliminação de radicais peróxidos. As hemácias dependem completamente da G6-PD para a produção de NADPH. A deficiência de G6-PD está associada a um quadro de anemia hemolítica hereditária não esferocítica. Os fenômenos de hemólise são particularmente freqüentes em situações em que há aumento de estresse oxidativo, como no período neonatal, durante infecções e com o uso de determinados medicamentos (CHAN et al., 1999).

### 2.7.3 Talassemias

As talassemias constituem um grupo heterogêneo de desordens hereditárias caracterizadas por um ou mais defeitos na síntese das cadeias globina da hemoglobina, determinados por mutação gênica. As desordens são geneticamente classificadas como  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , dependendo do gene da globina envolvida. Em  $\alpha$ -talassemia, o defeito reside na síntese de cadeia  $\alpha$ , enquanto em  $\beta$ -talassemia, a anormalidade é da cadeia  $\beta$ . Em ambos os casos, há redução da concentração de Hb A nas células vermelhas, com excesso de cadeias de globina não pareadas (SIMMONS, 1997). Entre as formas mais graves está a  $\beta$ -talassemia maior, na qual há supressão parcial ou total da produção de cadeias  $\beta$ , tornando necessárias transfusões sangüíneas regulares para compensar os eritrócitos no sangue dos pacientes. Enquanto isso, a forma homozigota da  $\alpha$ -talassemia é incompatível com a vida (OLIVIERI, 1999).

O desequilíbrio de síntese de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  globina dificulta a incorporação da hemoglobina nos eritroblastos, causando apoptose dos mesmos na medula óssea, um processo conhecido como eritropoiese ineficaz ou hemólise intramedular. Além de dificultar a incorporação, também ocorre formação de tetrâmeros em excesso, por exemplo, tetrâmeros  $\beta$  em  $\alpha$ -talassemia e tetrâmeros  $\alpha$ , em  $\beta$ -talassemia. Estes tetrâmeros são instáveis e incapazes de liberar o oxigênio, favorecendo a hemólise (JANDL, 1996).

#### 2.7.3.1 $\alpha$ -talassemia

A  $\alpha$ -talassemia é causada por anulação de grandes fragmentos de DNA que envolvem um ou ambos os genes da  $\alpha$ -globina e consiste na supressão total ou parcial de síntese de cadeias globina  $\alpha$ . A deficiência na síntese de cadeias  $\alpha$  resulta no acúmulo de cadeias  $\gamma$  no período fetal e em recém-nascidos; e cadeias  $\beta$  nos primeiros anos de vida. São sintetizadas cadeias de  $\gamma$  e  $\beta$  formando tetrâmeros  $\gamma_4$  (Hemoglobina Bart's) e  $\beta_4$  (hemoglobina H). Estes tetrâmeros são instáveis; termolábeis; possuem afinidade 10 vezes maior por oxigênio em comparação com a Hb A, o que dificulta a oxigenação dos tecidos; são facilmente oxidados e tendem a se precipitar (LUKENS, 1999).

A hidropsia fetal com Hb Bart's está associada à ausência total das cadeias  $\alpha$ , incompatível com a vida, resultando em natimortos. Na doença de Hb H, a desordem é caracterizada pela anemia hemolítica moderada a severa, com a síntese das cadeias  $\alpha$  aproximadamente um terço da síntese das cadeias  $\beta$ . A relação  $\beta:\alpha$  nos indivíduos portadores de  $\alpha$ -talassemia menor é de 1,25 e as células vermelhas apresentam alterações morfológicas mínimas. O portador silencioso é associado com a relação  $\beta:\alpha$  1,15 e não apresenta nenhuma anormalidade hematológica (LUKENS, 1999).

A  $\alpha^0$  talassemia resulta na deleção gênica da  $\alpha$ -globina. O haplótipo de um indivíduo normal é designado de  $(\alpha\alpha)$ ; nos indivíduos com  $\alpha$ -talassemia é  $(--)$ . Algumas  $\alpha^+$  talassemias resultam na deleção de apenas um dos dois genes da alfa globina  $(-\alpha)$  ou uma mutação que limita a expressão do gene alfa  $(\alpha\alpha^T)$  (LUKENS, 1999). As síndromes  $\alpha$ -talassêmicas são classificadas em: "portador silencioso" ou  $\alpha$ -talassemia mínima, traço  $\alpha$ -talassemia, doença de Hb H e hidropsia fetal (NAOUM, 1997) (Quadro 1).

QUADRO 1 - SÍNDROMES  $\alpha$ -TALASSÊMICAS

| Fenótipo                   | Genótipo   | Manifestações clínicas                    | Hemoglobina variante                    |  |
|----------------------------|--|---|---|--|
|                            |  |   | Recém-nascidos                          | Após o 1º ano                                      |
| Hidropsia Fetal            | $(--/--)$  | Morte neonatal ou fetal com anemia severa | Hb Bart's (80 – 90%), Hb H, Hb Portland | -  |
| Doença Hb H                | $(--/-\alpha)$<br>$(--/\alpha\alpha^T)$<br>$(--/\alpha^{CS}\alpha)$<br>$(\alpha\alpha^T/\alpha\alpha^T)$ | Anemia hemolítica crônica                 | Hb Bart's (20 – 70%)                    | Hb H (5 – 40%), Hb Bart's, Hb CS (Constant-Spring) |
| $\alpha$ -talassemia menor | $(--/\alpha\alpha)$<br>$(-\alpha/-\alpha)$<br>$(-\alpha/\alpha\alpha^T)$                                 | Pouca ou sem anemia, VCM e HCM diminuído  | Hb Bart's (2 – 10%)                     | Nenhum   |
| Portador silencioso        | $(-\alpha/\alpha\alpha)$   | Nenhuma anormalidade hematológica         | Hb Bart's (0 – 2%)                      | Nenhum   |

Fonte: Lukens (1999)

### 2.7.3.2 $\beta$ -talassemia

Como na  $\alpha$ -talassemia, a  $\beta$ -talassemia também é resultante de mutação que causa diminuição na produção de mRNA e da síntese normal de cadeias globínicas. As síndromes  $\beta$ -talassêmicas são causadas por mutações gênicas que afetam a regulação ou expressão do gene, em contraste com a  $\alpha$ -talassemia, onde ocorre deleção gênica (LUKENS, 1999). As formas clínicas com que a  $\beta$ -talassemia se manifesta, de acordo com a gravidade dos sinais e sintomas, são denominadas maior, intermediária, menor e mínima, e dependem do grau de expressão do gene e da forma de herança, podendo ocorrer diversas associações. Assim, um portador de  $\beta$ -talassemia pode herdar genes  $\beta^0$  e ou  $\beta^+$  em homozigose ou heterozigose, entre si ou com a normalidade.

Nos indivíduos homozigotos,  $\beta^0$  talassêmicos, a síntese da  $\beta$  globina é ausente. Com isso, o mRNA nos reticulócitos ou células precursoras de células vermelhas é deficiente ou ausente (LUKENS, 1999).

As células eritrocitárias talassêmicas são sujeitas à auto-oxidação, que é refletida pelo aumento de malonilaldeído após o estresse oxidativo. Os mecanismos que contribuem com a injúria oxidativa são numerosos, incluindo o excesso de ferro intracelular e auto-oxidação das globinas instáveis que geram espécies reativas de oxigênio (LUKENS, 1999).

Nos indivíduos portadores de  $\beta$ -talassemia homozigotos, os sintomas são anemia hemolítica e hipocrômica severa, hiperplasia eritróide da medula óssea, hepatomegalia, esplenomegalia, retardamento do desenvolvimento somático e sexual e deformidades do esqueleto evidentes nos ossos do rosto e crânio. Em heterozigose, as manifestações clínicas são variáveis, com quadros clínicos classificados como  $\beta$ -talassemia maior, intermédia, menor e mínima. Nos dois últimos casos os pacientes podem ser assintomáticos e, se houver anemia, esta será menos severa, sendo que o paciente muitas vezes tem vida normal (JANDL, 1996).

Os portadores heterozigotos da  $\beta$ -talassemia apresentam baixa hemoglobina corpuscular média (HCM), baixo volume corpuscular médio (VCM), alterações morfológicas leves de seus glóbulos vermelhos, nível aumentado de HbA<sub>2</sub>, e uma baixa relação entre cadeias  $\beta/\alpha$  (HIGGS & WEATHERALL, 1993).

Um fator importante na patogênese da  $\beta$ -talassemia é a quantidade de cadeias  $\alpha$  livres que se precipitam no interior da célula eritróide, causando dano grave e morte celular. O excesso de cadeias  $\alpha$  está relacionado com a magnitude da eritropoiese ineficaz. De acordo com o Protocolo da Federação Internacional de Talassemia (TIF), isso implica em que se deve esperar uma condição talassêmica mais branda quando:

- o defeito talassêmico não provoca a ausência completa de síntese das cadeias  $\beta$  mas sim uma síntese reduzida, o que leva a menos excesso de cadeias  $\alpha$ ;
- é alta a quantidade de cadeias  $\gamma$  que ficam disponíveis no interior das células eritróides talassêmicas devido à ativação dos respectivos genes, porque esses últimos neutralizam uma grande parte das cadeias  $\alpha$  não ligadas, e;
- é suprimida a síntese de cadeias  $\alpha$  pela presença concomitante de um ou mais defeitos dos  $\alpha$ -talassêmicos.

A  $\beta$ -talassemia maior é uma condição na qual indivíduos homozigotos apresentam supressão total da produção de cadeias  $\beta$ , ou mesmo heterozigotos, apresentam supressão importante da produção de cadeias  $\beta$ . As manifestações clínicas surgem nos primeiros anos de vida. Há supressão das cadeias  $\beta$ -globina, enquanto a produção de cadeias  $\alpha$  ocorre normalmente, causando um acúmulo de cadeias  $\alpha$ . Estas precipitam e formam inclusões intracelulares, observadas em células eritróides jovens. As inclusões podem interagir com algumas áreas da membrana, diminuindo a deformabilidade dos eritrócitos talassêmicos (HARRIS, 1991).

A disfunção cardíaca é comum nos pacientes com  $\beta$ -talassemia maior pela frequência de transfusões sangüíneas e absorção excessiva gastrointestinal do ferro (OLIVIERI, 1999)

As características encontradas no hemograma são: anemia microcítica hipocrômica, com hemoglobina inferior a 6,5 g/dl; anisocitose; poiquilocitose; eliptócitos e células alvo. Observa-se alto índice de corpos de Heinz, devido à precipitação das cadeias globina. Os reticulócitos variam de 5 a 15%. A fragilidade osmótica é diminuída e a resistência de lise em meio hipotônico é aumentada. A maioria dos pacientes apresenta ligeira trombocitose (SIMMONS, 1997).

São encontrados cerca de 94% de Hb F e 3,5 a 8,0% de Hb A<sub>2</sub> nos indivíduos portadores de  $\beta$ -talassemia maior (SIMMONS, 1997).

A  $\beta$ -talassemia intermediária é uma condição clínica não tão grave quanto a anterior, na qual é produzido um alelo homozigoto de alguns genes de  $\beta$  globina. Estes indivíduos não são dependentes de transfusão, apresentando níveis de hemoglobina que variam de 7 a 11 g/dl. Os achados hematológicos são similares aos de  $\beta$ -talassemia maior, porém em menor intensidade (SIMMONS, 1997).

Em alguns pacientes, pode ocorrer esplenomegalia pelo excesso de destruição de glóbulos vermelhos, o que leva a hiperesplenismo e anemia, tornando o paciente dependente de transfusões. Isso pode ser revertido com a esplenectomia (WEATHERALL, 1981).

A  $\beta$ -talassemia menor é uma condição em que indivíduos heterozigotos em geral são assintomáticos, podendo apresentar a concentração de hemoglobina ligeiramente diminuída. Pode haver diminuição do nível de hemoglobina em certas situações como, por exemplo, em infecções ou processos inflamatórios crônicos, na infância ou durante a gravidez (ZAGO, 2004).

Os achados laboratoriais são: anemia discreta e reticulocitose. As alterações eritrocitárias comuns em  $\beta$ -talassemia menor são: microcitose, hipocromia, anisocitose, poiquilocitose, pontilhado basófilo e presença de codócitos. A fragilidade osmótica é diminuída, como na  $\beta$ -talassemia maior, proporcionalmente ao número de codócitos presentes. Os níveis de Hb A<sub>2</sub> e Hb F podem ser encontrados discretamente elevados na eletroforese de hemoglobinas (SIMMONS, 1997).

QUADRO 2 - SÍNDROMES  $\beta$ -TALASSÊMICAS

| Genótipo  | Hb A (%) | Hb A2 (%)  | Hb F (%)            | Outras Hb           |
|---|----------|------------|---------------------|---------------------|
| Normal  |          |            |                     |                     |
| $\beta/\beta$                                   | 97       | 2,5 – 3,2  | <1                  | Nenhuma             |
| $\beta$ -talassemia maior                       |          |            |                     |                     |
| $\beta^0/\beta^0$                               | 0        | 1,0 – 5,9  | > 94                | Cadeia alfa livre   |
| $\beta^+/\beta^+$ , Mediterrâneo                | Presente | 2,4 – 8,7  | 20 - 90             | Cadeia alfa livre   |
| $\beta^0/\beta^+$                               | Presente | 0,6 – 3,4  | >75                 | Nenhuma             |
| $(\delta\beta)^{Lepore}/(\delta\beta)^{Lepore}$ | 0        | 0          | 70 - 92             | Hb Lepore (8 – 30%) |
| $\beta$ -talassemia intermediária               |          |            |                     |                     |
| $\beta^+/\beta^+$ , negra                       | Presente | 5,4 – 10,0 | 30 - 73             | Nenhuma             |
| $\beta^0/(\gamma\beta)^0$                       | 0        | 0,3 – 2,4  | 60 - 99             | Nenhuma             |
| $\beta^+/(\gamma\beta)^0$                       | 20 - 30  | Diminuída  | Aumentada           | Nenhuma             |
| $\beta^0/(\gamma\beta)^{Lepore}$                | 0        | Diminuída  | Aumentada           | Hb Lepore (10%)     |
| $\beta^+/(\gamma\beta)^{Lepore}$                | Presente | Diminuída  | Aumentada           | Hb Lepore (10%)     |
| $\beta^0/\beta$                                 | Presente | > 3,2      | 1,5 - 12            | Nenhuma             |
| $(\gamma\beta)^0/(\gamma\beta)^0$               | 0        | 0          | 100                 | Nenhuma             |
| $(\gamma\beta)^0/(\gamma\beta)^{Lepore}$        | 0        | 0          | 92                  | Hb Lepore (8%)      |
| $\alpha/\beta$                                  | Presente | Diminuída  | Normal ou Diminuída | +/- Hb H            |
| $\beta/\beta$ Durham-NC                         | 90       | 3,3        | 6                   | Nenhuma             |
| $\beta$ -talassemia menor                       |          |            |                     |                     |
| $\beta^+/\beta$                                 | > 90     | 3,5 – 8,0  | 1 – 2               | Nenhuma             |
| $\beta^0/\beta$                                 | > 90     | 3,5 – 8,0  | 1 – 2               | Nenhuma             |
| $(\delta\beta)^0/\beta$                         | < 90     | 2,5 – 3,0  | 5 – 20              | Nenhuma             |
| $(\gamma\beta)^{Lepore}/\beta$                  | Presente | 1,2 – 2,6  | 1 – 3               | Hb Lepore (5 – 15%) |
| $(\gamma\delta\beta)^0/\beta$                   | Presente | 2,5 – 3,2  | < 1 - 2             | Nenhuma             |
| $\beta$ talassemia mínima                       |          |            |                     |                     |
| $\beta^{silencioso}/\beta$                      | 97       | <3,2       | < 1                 | Nenhuma             |

Fonte: Lukens (1999)

### 2.7.3.3 $\delta\beta$ -talassemia

Caracterizada pela diminuição ou ausência da síntese de cadeias  $\delta$  e  $\beta$  globinas. Apesar de estar aumentada, a cadeia  $\gamma$  globina é insuficiente para compensar a deficiência das cadeias  $\delta$  e  $\beta$ . O nível de Hb F é mais elevado que  $\beta$ -talassemia podendo chegar a ter 100% no total de hemoglobina, no estado homozigoto (LUKENS, 1999).

### 2.7.3.4 $\gamma\delta\beta$ -talassemia

Tipo raro de talassemia caracterizada pela deleção ou inativação do complexo do gene  $\beta$ . A perda do complexo compromete o distúrbio da conformação da cromática causada pela deleção ou perda da seqüência 5, que é necessária para a expressão do gene  $\beta$  globina. (LUKENS, 1999).

### 2.7.3.5 Talassemias e transfusão sangüínea

O tratamento da  $\beta$ -talassemia maior envolve transfusões regulares de sangue, usualmente administradas cada duas a cinco semanas, a fim de manter o nível de hemoglobina acima de 9 - 10,5 g/dl. Esses pacientes recebem, a cada transfusão, um volume de hemácias de 15 - 17 ml/kg corporal. Esse regime de transfusão favorece o crescimento normal, permite atividades físicas normais e suprime adequadamente a atividade da medula óssea (CAZZOLA et al., 1995), sendo que intervalos mais curtos entre as transfusões podem reduzir as necessidades globais de sangue. A escolha do intervalo entre as transfusões deve levar em conta outros fatores, como o trabalho do paciente ou a programação escolar (HAMERSCHLACK, 2008).

A decisão de iniciar uma terapia de transfusão por toda a vida deve ser baseada em um diagnóstico definitivo de talassemia grave. Esse diagnóstico deve levar em consideração o defeito molecular, a gravidade da anemia em medições repetidas, o nível de eritropoiese ineficaz e critérios clínicos como a incapacidade de progredir ou as alterações ósseas (HAMERSCHLACK, 2008).

Os pacientes com talassemia devem receber glóbulos vermelhos leucodepletados. A redução dos leucócitos para  $5 \times 10^6$ /unidade eritrocitária é



considerada o limiar crítico para eliminação das reações adversas atribuídas aos glóbulos brancos contaminantes e para a prevenção da aloimunização das plaquetas (SPROGOE-JAKOBSEN, 1995).

Antes de iniciar uma terapia de transfusão, é realizada uma tipagem dos antígenos dos glóbulos vermelhos dos pacientes, incluindo pelo menos C, c, E, e, e Kell, a fim de ajudar a identificar e caracterizar os anticorpos em caso de imunização tardia. Todos os pacientes com talassemia devem ser transfundidos com sangue compatível ABO e Rh(D). Alguns clínicos recomendam o uso de sangue que seja compatível também em relação, pelo menos, aos antígenos C, E e Kell, a fim de evitar a aloimunização contra esses antígenos (HAMERSCHLACK, 2008).

O volume recomendado de glóbulos vermelhos transfundidos pode variar, de acordo com o uso de diferentes soluções anticoagulantes-preservativas. Para as unidades eritrocitárias CPD-A com hematócrito de aproximadamente 75%, o volume por transfusão é usualmente de 10 - 15 ml/kg, administrada durante 3 - 4 horas. As unidades com soluções aditivas podem ter hematócrito de 60 - 70%, sendo então necessários volumes maiores para administrar a mesma massa de glóbulos vermelhos fornecida por unidades CPD-A, cujo hematócrito é mais elevado. Na maioria dos pacientes, é importante evitar essas diferenças de concentração dos glóbulos vermelhos, em geral prescrevendo uma ou duas unidades em vez de um volume particular de sangue. Crianças mais jovens podem requerer uma fração de unidade para se evitar sub ou super-transfusão. Os pacientes com insuficiência cardíaca ou níveis iniciais de hemoglobina muito baixos, devem receber quantidades menores de glóbulos vermelhos, com taxas de infusão mais lentas (HAMERSCHLACK, 2008).

## 2.8 Desferoxamina

A desferoxamina (DFX) foi descoberta na década de 60 e somente foi utilizada em 1977-1978 em pacientes com anemia dependentes de transfusão crônica, quando se observou uma melhora da sobrevida dos pacientes talassêmicos que iniciaram o tratamento com este quelante (CRISPONI et al., 1999).

A desferoxamina (Figura 5) é um potente quelante de ferro, altamente específico para íon férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ), que auxilia a excreção de ferro na urina e na bile (FAA & CRISPONI, 1999). Trata-se de um ligando hexadentado, que se liga ao ferro

na proporção molar de 1:1 (BEUTLER et al., 2003). Por ser um antioxidante, atua na prevenção do estresse oxidativo e é utilizado no tratamento das doenças hemolíticas que requerem transfusões constantes, devido a sua habilidade em remover e descompartimentalizar o ferro em excesso (NIIHARA et al., 2000).

A administração de desferoxamina é feita por via parenteral ou subcutânea, através de uma bomba infusora. Pode resultar na excreção urinária de 20 a 50 mg de ferro ao dia, caso seja feita infusão subcutânea noturna (SCHAFER et al., 1985). A terapia considerada padrão é de 40 mg/kg, por infusão subcutânea durante o período de 8 – 12 horas por 5 a 7 noites (HOFFBRAND, 2003)

Os raros efeitos adversos conhecidos pela toxicidade da desferoxamina são neurotoxicidade visual e auditiva e displasia de crescimento dos ossos longos em crianças, com falha no crescimento linear (HOFFBRAND, 2005).

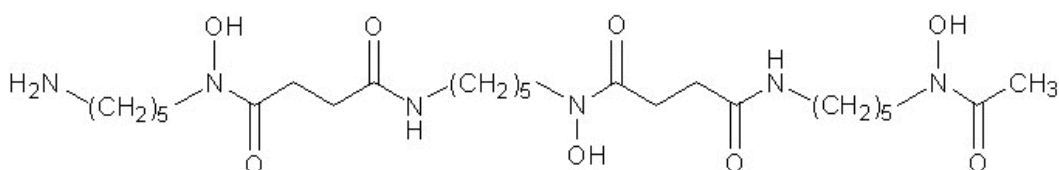


FIGURA 5 - DESFEROXAMINA

## 2.9 Deferiprona

A deferiprona foi desenvolvida no laboratório de R. C. Hilder, utilizada em testes clínicos no ano 1987 e licenciada em 25 países para pacientes portadores de  $\beta$ -talassemia maior cujos tratamentos com desferoxamina não foram eficientes (HOFFBRAND, 2003).

A deferiprona (Figura 6) é um agente quelante de ferro pertencente à classe 3-hidroxipiridin-4-ona (1,2 dimetil-3-hidroxipiridin-4-ona), também conhecido como L1, que pode ser administrado oralmente. A deferiprona é um ligando bidentado e se liga ao ferro na proporção molar de 3:1, mobiliza a sua retirada nos sistemas parenquimático e reticuloendotelial, em transferrina, ferritina e hemossiderina, e permite a sua excreção pela urina (Figura 7). (HOFFBRAND, 2005).

Os efeitos adversos, quando excedida a concentração de deferiprona em relação aos níveis considerados adequados ao tratamento, são: agranulocitose,

artropatia, distúrbios gastrointestinais, deficiência de zinco e alterações das enzimas transaminases (HOFFBRAND, 2005).

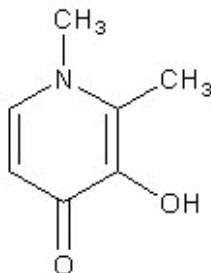


FIGURA 6 - DEFERIPRONA (L1)

## 2.10 Desferoxamina x Deferiprona

Em relação ao número de sítios de coordenação, os quelantes de ferro são classificados como hexadentados, tridentados ou bidentados. A denticidade é diretamente relacionada com o peso molecular de cada composto. Os hexadentados possuem peso molecular elevado. Contudo, a sua difusão nas membranas biológicas, absorção gastrointestinal e penetração celular são influenciadas, não somente pelo peso molecular, mas pela lipofilicidade e carga molecular. A desferoxamina é um quelante hexadentado e tem sua absorção dificultada no trato gastrointestinal; o outro derivado de ácido hidroxibenziletilenodiamino diacético (HBED), é um quelante hexadentado, mas possui absorção oral ativa. Os quelantes tridentados e bidentados possuem absorção ativa por via oral e penetram no interior das células com facilidade (GALANELLO, 2004).

Apesar de que a introdução de desferoxamina no tratamento da  $\beta$ -talassemia maior tenha melhorado sensivelmente a sobrevida dos pacientes, cerca de 50% deles ainda morrem antes dos 35 anos de idade, por insuficiência cardíaca secundária à sobrecarga de ferro. Um dos motivos que podem contribuir para esta realidade é a dificuldade dos pacientes aderirem a um tratamento mais longo, exigindo a aderência durante cinco a sete dias da semana, o que compromete um pouco a eficácia na quelação do ferro (FABRON & TRICTA, 2003). Os fatores limitantes para a incidência de doença cardíaca nos pacientes  $\beta$ -talassêmicos maior

seriam: realizar cerca de 265 infusões por ano ou manter o nível de ferritina de 2500 µg/l (GABUTTI & PIGA, 1996).

A eficácia da deferiprona no efeito cardioprotetor se deve aos seguintes fatores: lipofilicidade, carga neutra em pH 7,4, e baixo peso molecular, que permite atravessar as membranas celulares e ligar-se ao ferro intracelular (LINK et al., 2001). CECI et al. (2002) observaram que, em pacientes usuários de deferiprona, houve uma redução dos níveis de ferritina de 2579 µg/l para 2320 µg/l, em um período de 3 anos. PIGA et al. (2003) analisaram a eficácia do tratamento longo com deferiprona em pacientes talassêmicos maior, concluindo que houve um efeito cardioprotetor, permitindo uma maior sobrevivência.

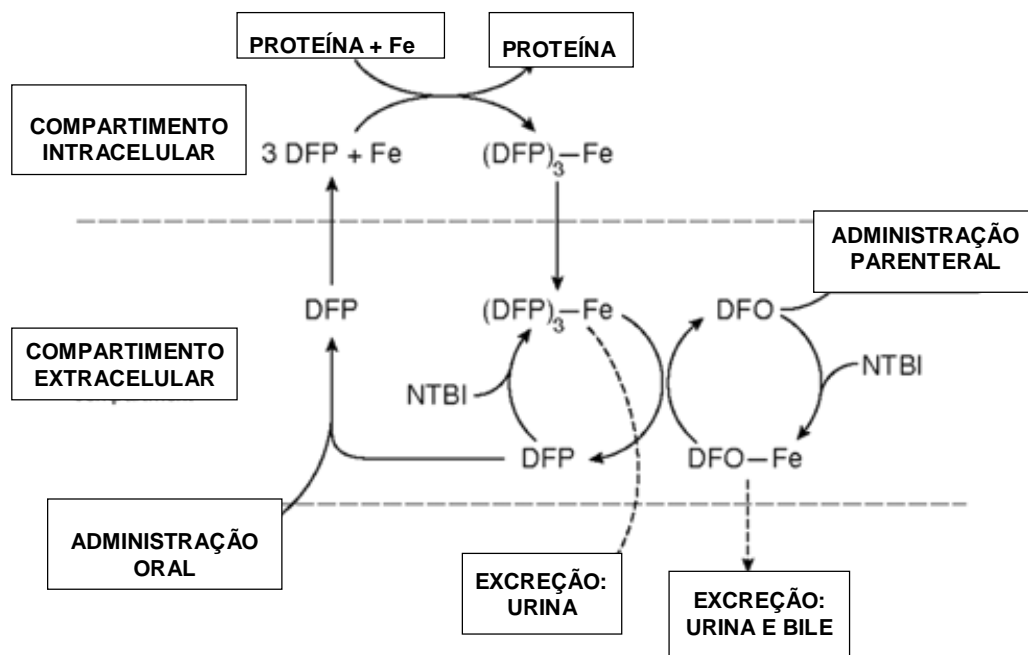
Ao contrário da desferoxamina, observou-se que a deferiprona é capaz de quelar o ferro nas células vermelhas intactas *in vitro* e *in vivo* (HOFFBRAND, 2003).

Com o emprego de terapia combinada dos dois quelantes, desferoxamina e deferiprona, observou-se um efeito aditivo ou sinérgico na ligação com o ferro. A deferiprona entra nas células de forma mais fácil que a desferoxamina, podendo se ligar ao ferro intracelular e transferi-lo para o meio extracelular. O ferro extracelular poderá então ser quelado por desferoxamina no plasma, possibilitando sua excreção pela urina e/ou fezes, como mostra a Figura 7 (LINK et al., 2001). WONKE et al. (1998) observaram que, nos pacientes talassêmicos tratados com a terapia combinada, houve maior redução da ferritina sérica em relação ao que não acontecia quando tratados isoladamente por um ou outro quelante.

KATTAMIS et al. (2006) também estudaram pacientes talassêmicos após a terapia combinada e concluíram que, se administradas em conjunto três vezes por semana, a desferoxamina e a deferiprona demonstram eficiência na melhoria da função cardíaca em pacientes talassêmicos dependentes de transfusão.

A terapia apenas com deferiprona tem sido considerada inadequada para diminuir o conteúdo do ferro hepático em alguns pacientes, enquanto a terapia com desferoxamina é incriminada por complicar o quadro cardíaco (HOFFBRAND et al., 2003). Sugere-se, desta forma, que a terapia combinada pode surtir melhor efeito devido à eficiência da atuação dos quelantes em locais diferentes (KATTAMIS et al., 2006).

Figura 7 - ESQUEMA DE TERAPIA COMBINADA COM DESFEROXAMINA E DEFERIPRONA E SUA AÇÃO FARMACOLÓGICA



Fonte: Liu et al. (2002)

### 2.11 Agente oxidante: *tert*-butilhidroperóxido (TBHP)

O TBHP está sendo aplicado como um modelo de agente oxidante sobre eritrócitos, especialmente para se avaliar a sobrecarga oxidativa em proteínas eritrocitárias. A ação do TBHP na concentração de 0,5 mmol/l durante 60 min sobre eritrócitos humanos resultou em formação de metahemoglobina, além de induzir ao aparecimento de agregados de proteínas de membrana de alto peso molecular (MOORE et al., 1989). Concentrações menores do mesmo, da ordem de 0,2 mmol/l, levaram a modificações nas proteínas citosólicas, contudo sem formação de oligômeros de alto peso molecular (RICE-EVANS et al., 1985). Na concentração de 0,5 mmol/l, no entanto, a atividade enzimática foi comprometida, especialmente em algumas bombas de íons, entre elas a  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  ATPase. Essa inibição parece ser seletiva, pois outras enzimas presentes na membrana do eritrócito não

apresentaram o mesmo padrão de inibição, entre elas a acetilcolinesterase (MOORE et al., 1989). Em eritrócitos de rato, o TBHP revelou-se capaz de exercer ação oxidante seletiva sobre proteínas do citoesqueleto, banda 2.1 e anquirinas. Em ratos com dieta deficiente em selênio, a ação oxidante foi mais acentuada, revelando a importância do metabolismo de GSH para o sistema antioxidante eritrocitário, visto que o selênio é um co-fator necessário para a atividade de GSH-Px (SUZUKI et al., 1988).

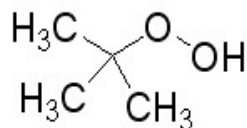


FIGURA 8 – *tert*-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP)

### 3. OBJETIVOS:

#### 3.1 Objetivo principal

- Estudar a ação de desferoxamina e deferiprona sobre eritrócitos normais e de pacientes portadores de  $\beta$ -talassemias submetidos à sobrecarga oxidativa com *terc*-butilhidroperóxido, *in vitro*.

#### 3.2 Objetivos secundários

- Verificar a influência do ferro no processo oxidativo em eritrócitos.
- Estudar o processo oxidativo em eritrócitos de indivíduos portadores de  $\beta$ -talassemias.
- Verificar as alterações no metabolismo oxidativo dos eritrócitos através das determinações das concentrações da metahemoglobina, da glutathiona reduzida, da contagem de corpos de Heinz, das porcentagens de hemólise e das atividades enzimáticas glicose 6-fosfato desidrogenase e glutathiona redutase.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS:

### 4.1 Material

O material utilizado compreende amostras de sangue venoso de indivíduos portadores de  $\beta$ -talassemia maior atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR) (Grupo A); e de seus familiares assintomáticos ou com formas clínicas leves, portadores de  $\beta$ -talassemia menor (Grupo B). Foram utilizadas amostras de indivíduos considerados normais, como controle (Grupo C), os quais não apresentavam sinais ou sintomas de doença e foram considerados aptos como doadores de sangue no HEMEPAR, de acordo com as normas vigentes (Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA, nº 153, de 14 de junho de 2004).

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Coleta de material

Coletou-se amostras de sangue venoso em citrato-fosfato-dextrose-adenina (CPDA<sub>2</sub>), após consentimento informado, de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor de Saúde da Universidade Federal do Paraná (Anexo II). Coletou-se 50 a 100 ml de sangue venoso de 6 indivíduos considerados normais e aptos a serem doadores de sangue, de acordo com os critérios preconizados pelo Ministério da Saúde para doadores em hemoterapia (Resolução nº 153, de 14 de junho de 2004) (Grupo C).

Foram coletadas 5 amostras de 10 ml de sangue venoso de portadores de  $\beta$ -talassemia menor (Grupo B) e 10 amostras dos pacientes  $\beta$ -talassêmicos maior (Grupo A), atendidos no HEMEPAR. O Grupo A foi subdividido em dois grupos, conforme a medicação: Grupo A1, usuários de desferoxamina e deferiprona; Grupo A2, usuários somente de desferoxamina. Nenhum dos pacientes utilizava somente deferiprona no tratamento. As amostras foram coletadas antes da transfusão sangüínea, praticada rotineiramente, a cada 30 dias.



#### 4.2.2 Descrição das técnicas envolvidas:

##### 4.2.2.1 Isolamento e lavagem de eritrócitos

As amostras de sangue venoso do Grupo C foram centrifugadas à 4°C em 1200 x g por 10 min, retirando-se o plasma e a camada de leucócitos por aspiração com bomba de vácuo. Em seguida, os eritrócitos foram lavados com solução gelada de 154 mmoles/l de NaCl por três vezes, por centrifugação a 1200 x g durante 5 min.

Os eritrócitos foram ressuspensos em 150 mmoles/l de tampão fosfato e 154 mmoles/l de NaCl pH 7,4, acertando-se o volume globular a cerca de 40%, através do método de microhematócrito (DACIE & LEWIS, 1995). Separou-se alíquotas de 1 ml de suspensão de eritrócitos em tubos de hemólise, centrifugou-se por 5 min a 1200 x g, retirou-se um volume de sobrenadante correspondente ao volume de solução reagente a ser adicionado, não se alterando assim o volume globular final da suspensão de eritrócitos, como será descrito nos itens 4.2.2.2 e 4.2.2.3.

As amostras do Grupo A não foram lavadas, com o objetivo de manter a integridade dos eritrócitos contendo desferoxamina e deferiprona. Estas amostras só foram incubadas com o oxidante *terc*-butilhidroperóxido. As amostras do grupo B, foram centrifugadas e procedidas igualmente ao grupo C, eliminando-se a fase de lavagem.

##### 4.2.2.2 Tratamento das amostras com quelantes de ferro

Foi realizado o tratamento das amostras com desferoxamina e/ou deferiprona seguida de indução de sobrecarga oxidativa com *terc*-butilhidroperóxido de acordo com as técnicas a seguir.

###### 4.2.2.2.1 Tratamento das amostras com substâncias quelantes de ferro

###### 4.2.2.2.1.1 Incubação de eritrócitos com desferoxamina

À suspensão de eritrócitos obtida, foi adicionada desferoxamina dissolvida em 154 mmoles/l de NaCl para concentrações finais de 1 a 4 mmoles/l, tendo-se como

controle suspensões incubadas em tampão. A homogeneização foi realizada por rotação em homogeneizador PHOENIX HS22 por 60 min.

#### 4.2.2.2.1.2 Incubação de eritrócitos com deferiprona

À suspensão de eritrócitos obtida, foi adicionada deferiprona (L1) dissolvida em 154 mmoles/l de NaCl para concentrações finais de 3 a 12 mmoles/l, tendo-se como controle suspensões incubadas em tampão. A homogeneização foi realizada por rotação em homogeneizador PHOENIX HS22 por 60 min.

#### 4.2.2.2.1.3 Incubação de eritrócitos com desferoxamina e deferiprona

À suspensão de eritrócitos obtida, foram adicionadas desferoxamina e deferiprona dissolvidas em 154 mmoles/l de NaCl para concentração de 4 mmoles/l de desferoxamina e 12 mmoles/l para deferiprona, tendo-se como controle suspensões incubados em tampão. A homogeneização foi realizada por rotação em homogeneizador PHOENIX HS22 por 60 min.

#### 4.2.2.3 Tratamento das amostras controle com substância oxidante *tert*-butilhidroperóxido (TBHP)

O *tert*-butilhidroperóxido foi dissolvido em 67 mmoles/l de tampão fosfato, pH 7,6, com glicose 200 mg/dl, adicionado a alíquotas de 1 ml de suspensão de eritrócitos para concentrações finais de 1 a 5 mmoles/l. A incubação ocorreu por 1 h à temperatura ambiente, sob constante homogeneização.

#### 4.2.2.3.1 Tratamento de amostras com desferoxamina:

Foi adicionada às alíquotas de 1 ml de suspensão de eritrócitos tratados com desferoxamina, conforme item 4.2.2.2.1.1, solução de *tert*-butilhidroperóxido para concentração final de 3 mmoles/l para as técnicas de metahemoglobina, glutatona reduzida, corpos de Heinz e porcentagem de hemólise; e 5 mmoles/l para as determinações enzimáticas, homogeneizando-se e incubando-se por 30 min à temperatura ambiente.

#### 4.2.2.3.2. Tratamento de amostras com deferiprona:

Solução de *terc*-butilhidroperóxido foi adicionada às alíquotas de 1 ml de suspensão de eritrócitos tratados com deferiprona, conforme item 4.2.2.2.1.2, para concentração final de 3 mmoles/l para as técnicas de metahemoglobina, glutatona reduzida, corpos de Heinz e porcentagem de hemólise; e 5 mmoles/l para as determinações enzimáticas, tendo-se homogeneizado e incubado por 30 min à temperatura ambiente.

#### 4.2.2.3.3 Tratamento de amostras com desferoxamina e deferiprona:

Solução de *terc*-butilhidroperóxido foi adicionada às alíquotas de 1 ml de suspensão de eritrócitos tratados com desferoxamina e deferiprona, conforme item 4.2.2.2.1.3, para concentração final de 3 mmoles/l para as técnicas de metahemoglobina, glutatona reduzida e corpos de Heinz.

#### 4.2.2.4. Contagem de corpos de Heinz

A contagem de corpos de Heinz foi realizada segundo a técnica de BEUTLER et al. (1955), modificada por CLARO et al. (1998).

Foram adicionados 25 µl das suspensões de eritrócitos obtidas nos experimentos descritos a 0,5 ml de tampão fosfato 67 mmoles/l, pH 7,4, com glicose 200 mg/dl, composto por 1,3 partes de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  67 mmoles/l e 8,7 partes de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  67 mmoles/l. Após homogeneização, sobre uma lâmina de microscopia, foram adicionados 20 µl da mistura e 20 µl de corante metil violeta (2 g de cristal violeta Sigma Aldrich em 100 ml de solução de NaCl 0,73 g/dl, diluído 1:2 com salina). Após 5 min, foi observada a formação de corpos de Heinz ao microscópio de luz, considerando como positivos eritrócitos que apresentassem mais de uma inclusão próxima à membrana ou livres no citoplasma. Segundo DACIE e LEWIS (1995), os corpos de Heinz são arredondados e, se corados por cristal violeta apresentam coloração azul violeta, medindo cerca de 1 a 3 µm. Após a contagem de 1000 células, estabelece-se a porcentagem de eritrócitos contendo corpos de Heinz.

#### 4.2.2.5 Determinação da concentração da metahemoglobina

A medida da concentração da metahemoglobina foi realizada segundo o método de EVELYN e MALLOY (1938), modificado por BEUTLER et al. (1955).

Em um tubo de ensaio são adicionados 10 ml de 16 mmoles/l de tampão fosfato e 100 µl de suspensão de eritrócitos, tratados com antioxidante(s) e/ou oxidante. Foi realizada uma homogeneização por inversão e, após 5 min, leitura espectrofotométrica (A) em comprimento de onda de 630 nm, utilizando-se como branco, água destilada. Nessa primeira leitura, a absorbância corresponde à metahemoglobina e outras substâncias cromógenas para 630 nm. Em seguida, foi adicionado 50 µl de uma solução de cianeto neutralizado (NaCN 10 g/dl e ácido acético 12 g/dl na proporção de 1:1). Após 5 min, foi feita homogeneização e nova leitura (B) a 630 nm, com água destilada como branco. Nessa etapa, a metahemoglobina desaparece.

Do tubo da leitura B foi retirada uma alíquota de 2 ml e misturada a 8 ml de 66 mmoles/l de tampão fosfato, pH 6,6. Após a homogeneização, a leitura (D) foi realizada em 540 nm, usando como branco 10 ml de tampão fosfato 66 mmoles/l, pH 6,6 e adicionando 50 µl de solução 10 g/dl de NaCN e 50 µl de solução de 20 g/dl de  $K_3[Fe(CN)_6]$ . Nessa etapa, estima-se a concentração de hemoglobina total.

A concentração de metahemoglobina foi expressa como uma porcentagem em relação à concentração total de hemoglobina, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ MetaHb} = \frac{(A - B) \times F}{D}$$

Onde:

F = Fator de correção determinado para cada espectrofotômetro utilizado, é a média dos fatores obtidos para as cinco amostras de sangue utilizadas.

O valor de referência para indivíduos normais é de até 1% (BEUTLER, 1963).

O F foi calculado utilizando-se sangue de 5 indivíduos saudáveis. Adicionou-se 100 ml de sangue total a um tubo de ensaio de 10 ml de 16 mmoles/l de tampão fosfato, juntou-se 50 ml de 20 g/dl de  $K_3[Fe(CN)_6]$ . As amostras foram homogeneizadas e, após 5 min, fez-se a leitura (A) em 630 nm (SHIMADZU UV 1601), utilizando-se água destilada como branco.

Em seguida, adicionou-se 50 ml de cianeto neutralizado. Homogeneizou-se as amostras e, após 5 min, fez-se a leitura (B) em 630 nm, usando-se água destilada como branco.

Em outro tubo, contendo 8 ml de 66 mmoles/l de tampão fosfato, adicionou-se 2 ml da mistura reativa anterior, 50 ml de 20 g/dl de  $K_3[Fe(CN)_6]$  e 50 ml de solução de 10 g/dl de NaCN. Homogeneizou-se as amostras e, após 5 min, fez-se a leitura (D) em 540 nm, usando como branco a mistura de 66 mmoles/l de tampão fosfato, e 50 ml de 20 g/dl de  $K_3[Fe(CN)_6]$  e 50 ml de solução de 10 g/dl de NaCN.

Para o cálculo do fator para cada amostra foi utilizada a seguinte fórmula:

$$F = 100 \times \frac{D}{A-B}$$

O F, que varia para cada espectrofotômetro utilizado, é a média dos fatores obtidos para 5 amostras de sangue utilizadas.

#### 4.2.2.6 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)

A determinação da concentração de GSH foi realizada pelo método preconizado por BEUTLER et al. (1963).

##### 4.2.2.6.1 Preparo do hemolisado

Em um tubo de ensaio, 200  $\mu$ l de suspensão de eritrócitos foram hemolisados em 2 ml de água destilada.

##### 4.2.2.6.2 Dosagem da concentração de hemoglobina

Uma alíquota de 200  $\mu$ l de hemolisado foi adicionada a 10 ml de reativo de Drabkin (DACIE; LEWIS 1995) para se estimar a concentração de hemoglobina da amostra, utilizando-se como padrão um sangue com concentração de hemoglobina conhecida, na diluição usual de 1:251. A leitura foi feita a 540 nm, em espectrofotômetro Shimadzu UV 1601.

#### 4.2.2.6.3 Dosagem da concentração de GSH

Foram adicionados 3 ml de solução precipitante (1,67 g de ácido metafosfórico glacial, 0,2 g de EDTA e 30 g de NaCl em 100 ml de água destilada) aos 2 ml do hemolisado, filtrando-se em papel filtro qualitativo após 5 min.

Uma alíquota de 1 ml do filtrado obtido foi adicionada a 8 ml de solução de 300 mmoles/l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Após a homogeneização, foi feita a leitura espectrofotométrica a 412 nm ( $A_1$ ). Logo depois, 1 ml de solução de DTNB (ácido 2-dinitrobenzóico) 0,05% foi adicionada e feita nova leitura em 412 nm ( $A_2$ ). Para o branco, adicionou-se 2 ml de solução precipitante diluída 2:5 em água destilada a 8 ml de solução de 300 mmoles/l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  para a leitura  $A_1$  e posteriormente acrescentado 1 ml de solução de DTNB para a leitura  $A_2$ .

A concentração de GSH pode ser expressa em  $\mu\text{mol}$  de GSH por gramas de hemoglobina, de acordo com a fórmula:

$$C = \frac{(A_2 - A_1) \times (E_1 \times 101)}{\text{Hb}}$$

Onde:

Hb = concentração de hemoglobina da amostra

$E_1$  = fator de correção para coeficiente de extinção molar 13,6 l/(moles.cm) do ânion amarelo produzido quando é formado um complexo cromógeno GSH-DNTB.

O fator de correção é utilizado quando o espectrofotômetro possui uma amplitude de onda maior que 6 nm, o que acarreta uma diminuição no coeficiente de extinção molar. O espectrofotômetro pode ser calibrado por comparação do valor de extinção no sistema teste ( $D_2$ ) com aquele obtido no espectrofotômetro com amplitude de onda menor que 6 nm a 412 nm ( $D_1$ ). O fator de correção derivado,  $E_1$ , é dado por  $D_1/D_2$  e é constante para o espectrofotômetro utilizado.

No caso do espectrofotômetro SHIMADZU UV 1601, não houve a necessidade de calcular o fator de correção, pois o aparelho não possui amplitude de onda maior que 6 nm. O valor usado para  $E_1$  é igual a 1.

O valor de referência em adultos normais é de  $6,57 \pm 1,04 \mu\text{moles/g}$  de Hb (BEUTLER, 1984).

#### 4.2.2.7 Determinação das porcentagens de hemólise

Foi determinada a concentração de hemoglobina extracelular no sobrenadante das suspensões de eritrócitos tratados com desferoxamina e/ou deferiprona com ou sem *terc*-butilhidroperóxido e somente com *terc*-butilhidroperóxido de acordo com os itens 4.2.2.2.1.1, 4.2.2.2.1.2, 4.2.2.2.1.3 e 4.2.2.3, respectivamente, pelo método do cianometahemoglobina adaptado para pequenas concentrações (PELISSARI et al., 1993). As diluições do sobrenadante em reagentes de Drabkin variam de acordo com o grau de hemólise observado visualmente, em relação à faixa de sensibilidade do método. Assim, na ausência de coloração rósea visível, a diluição foi de 1:3; para coloração de rósea tênue, foi de 1:15; para coloração levemente avermelhada, de 1:50; para coloração avermelhada, de 1:95 e vermelho intenso, de 1:110. O espectrofotômetro SHIMADZU UV 1601 foi utilizado para a determinação da absorbância. Abaixo, a fórmula para o cálculo da hemoglobina extracelular:

$$Hb\ e = \frac{A \times \text{Diluição}}{5,68}$$

Onde:

Hb e = Concentração de hemoglobina extracelular em g/dl;

A = Absorbância em 540 nm;

5,68 = Constante de proporcionalidade

Os cálculos das porcentagens de hemólise foram realizados segundo HÖGMAN et al. (1981), pela fórmula:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{(100 - Ht) \times Hbe}{Hb}$$

Onde:

Ht = hematócrito em %

Hb e = Concentração de hemoglobina extracelular em g/dl

Hb = Concentração de hemoglobina na suspensão de eritrócitos

#### 4.2.2.8 Determinação da atividade de enzimas do sistema antioxidante eritrocitário

##### 4.2.2.8.1 Preparo de hemolisado

Foi adicionado 0,1 ml da suspensão de eritrócitos a 1,9 ml de solução hemolisante (7 mmoles/l de  $\beta$ -mercaptoetanol (0,5 ml), 0,27 moles/l de EDTA neutralizado (10,0 ml) e água destilada q.s.p. para 1l), homogeneizando-se por agitação. Em seguida, procedeu-se aos dois ciclos de congelamento-degelo a  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante 5 min, seguido de descongelamento à temperatura ambiente por mais 5 min, repetindo-se o processo duas vezes consecutivas. O hemolisado obtido foi conservado a  $4^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização.

##### 4.2.2.8.2 Dosagem da hemoglobina do hemolisado

A determinação da concentração de hemoglobina de alíquotas dos hemolisados foi feita através de dosagem espectrofotométrica pelo método da cianometahemoglobina (PELISSARI et al., 1993)

##### 4.2.2.8.3 Determinação da atividade enzimática de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6-PD)

A determinação da atividade da G6-PD foi realizada segundo a técnica preconizada por Beutler (1984). O sistema de reação continha 100  $\mu\text{l}$  de 1 mol/l de Tris-HCl em 5 mmoles/l EDTA, pH 8,0; 100  $\mu\text{l}$  de 0,1 mol/l de  $\text{MgCl}_2$ ; 100  $\mu\text{l}$  de 2 moles/l NADP; 20  $\mu\text{l}$  do Hemolisado 1:20, em um volume final de 1 ml com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada e incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  por 10 min. A reação foi iniciada com a adição de 100  $\mu\text{l}$  de 6 mmoles/l de glicose 6-fosfato e monitorada espectrofotometricamente a 340 nm e a  $37^{\circ}\text{C}$ . Uma unidade internacional equivale a 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH formado por min.

$$\text{Atividade} = \frac{\Delta A \times 10^5}{6,22 \times 20 \times [\text{Hb}]}$$



Onde:

$\Delta A$  = variação de absorbância média por min

$10^5$  = diluição

6,22 = coeficiente de absorvidade molar do NADPH

20 = volume de hemolisado em  $\mu\text{l}$

[Hb] = concentração de hemoglobina do hemolisado em gramas por dl

Valor de Referência:  $12,1 \pm 2,09$  UI/g Hb por min a  $37^\circ\text{C}$  (BEUTLER, 1984).

#### 4.2.2.8.4 Determinação de atividade enzimática de glutathione redutase (GR)

A determinação da atividade da GR foi realizada segundo a técnica preconizada por Beutler (1984). O sistema de reação continha 50  $\mu\text{l}$  de 1 mol/l de Tris-HCl em 5 mmoles/l EDTA, pH 8,0 e 10  $\mu\text{l}$  do hemolisado 1:20, em um volume final de 850  $\mu\text{l}$  com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada e incubado a  $37^\circ\text{C}$  por 10 min. Em seguida foi adicionado 100  $\mu\text{l}$  de 33 mmoles/l GSSG e novamente incubado a  $37^\circ\text{C}$  por 10 min. A reação foi iniciada com a adição de 50  $\mu\text{l}$  de 2 mmoles/l NADPH e monitorada espectrofotometricamente a 340 nm e a  $37^\circ\text{C}$ . Uma unidade internacional equivale a 1  $\mu\text{mol}$  de NADP formado por min.

$$\text{Atividade} = \frac{\Delta A \times 10^5}{6,22 \times 10 \times [\text{Hb}]}$$

Onde:

$\Delta A$  = variação de absorbância média por min

$10^5$  = diluição

6,22 = coeficiente de absorvidade molar do NADPH

10 = volume de hemolisado em  $\mu\text{l}$

[Hb] = concentração de hemoglobina do hemolisado em gramas por dl

Valor de Referência:  $7,18 \pm 1,09$  UI/g Hb por min a  $37^\circ\text{C}$  (BEUTLER, 1984).

#### 4.3 Análise estatística dos resultados obtidos:

Os dados resultantes dos experimentos foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA inteiramente casualizada e fatorial), seguida do teste de Tukey para comparação de pares de médias. A significância estatística foi considerada para  $p < 0,05$ .

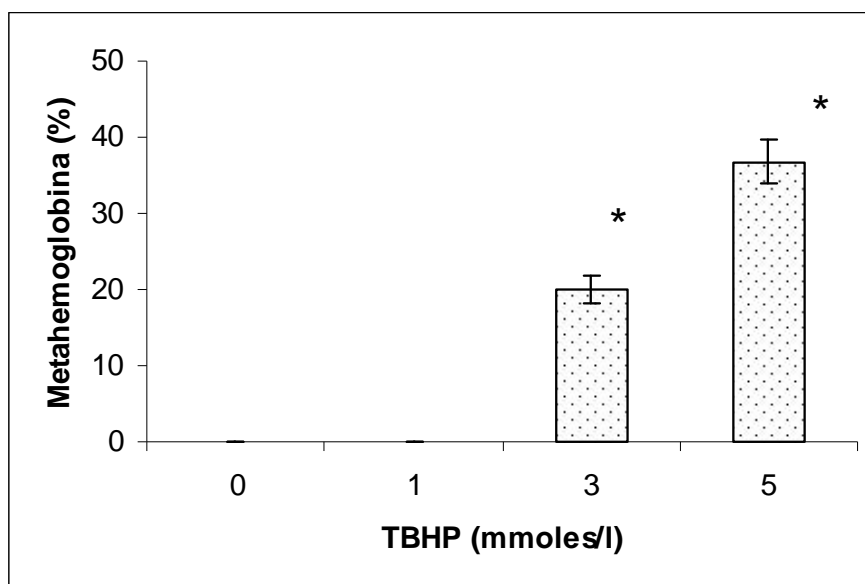
## 5. RESULTADOS

Os resultados obtidos no estudo do efeito de DFX e L1 sobre eritrócitos humanos normais e de portadores de  $\beta$ -talassemias estão representados abaixo.

As figuras 9 a 28 referem-se aos resultados obtidos de amostras de indivíduos considerados normais (grupo C).

A Figura 9 mostra a formação de metahemoglobina (%) nos eritrócitos, submetidos à ação de TBHP, em concentrações de 3 a 5 mmol/l. Com o aumento da concentração do oxidante, aumenta a formação de metahemoglobina, com diferenças estatísticas entre as concentrações de TBHP.

FIGURA 9 – FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE TBHP.



NOTAS: 0 = Amostra controle.

Incubação com 1, 3 e 5 mmol/l de TBHP, sob homogeneização por 1 h.

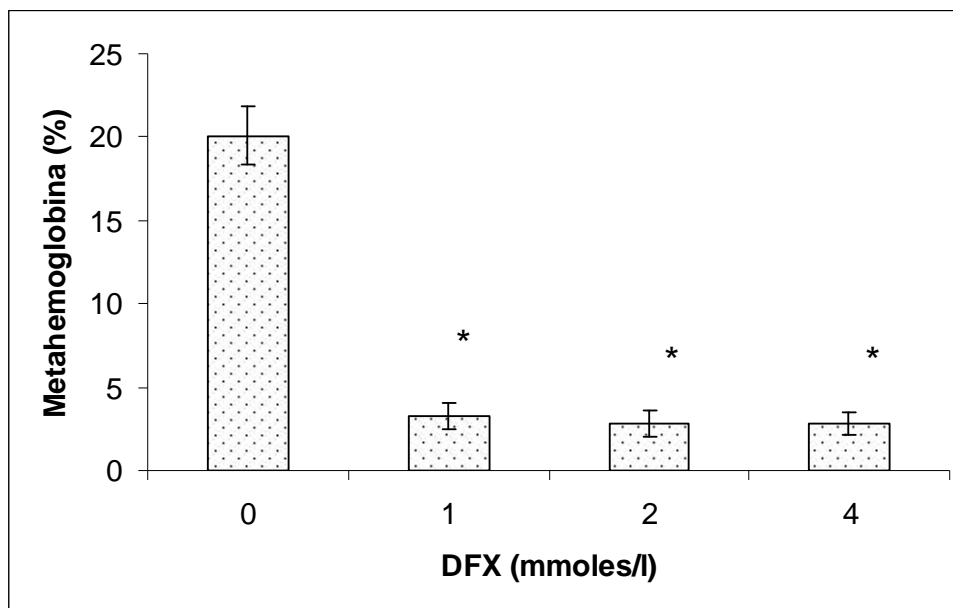
n = 12, a partir de 4 amostras realizadas em triplicata.

\* Diferença estatística significativa para  $p < 0,05$ .

As barras de erro representam os desvios padrão.

A Figura 10 mostra a concentração de metahemoglobina (%) nas amostras previamente tratadas com a DFX nas concentrações de 1, 2 e 4 mmoles/l e posteriormente induzidas à oxidação de TBHP na concentração de 3 mmoles/l. A DFX nas concentrações de 1, 2 e 4 mmoles/l reduz cerca de 85% de metahemoglobina produzida por TBHP, sem diferenças estatísticas significativas entre as concentrações de DFX.

FIGURA 10 – FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E POSTERIORMENTE SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l de TBHP



NOTAS: 0 = amostras tratadas somente com 3 mmoles/l de TBHP, sob homogeneização por 1 h (controle).

\* Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (Tukey  $p < 0,05$ )

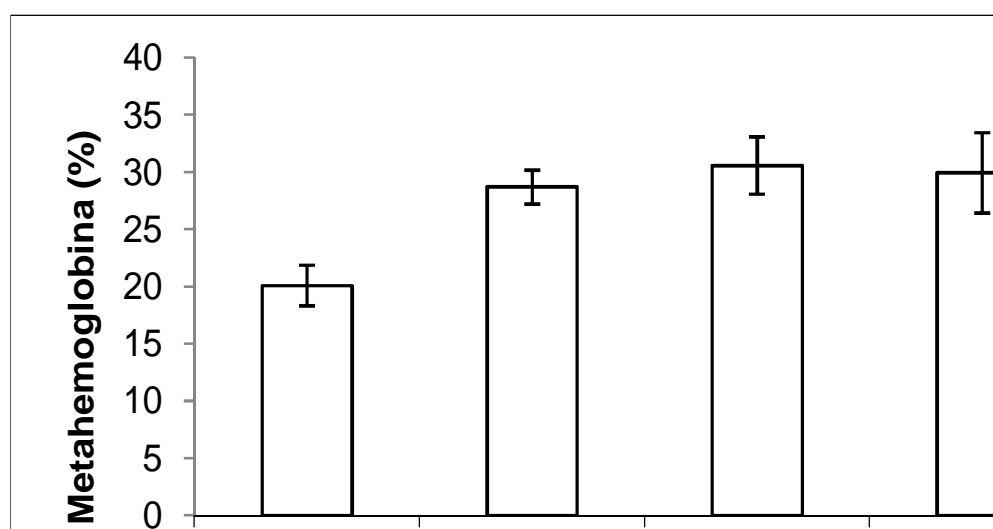
$n = 12$ , a partir de 4 amostras repetidas em triplicata.

As barras de erro representam os desvios padrão.

Não se observou diferenças significativas entre as concentrações de 1, 2 e 4 mmoles/l de DFX.

A Figura 11 apresenta a formação de metahemoglobina em eritrócitos humanos normais pré-tratados com L1, em concentrações de 3 a 12 mmoles/l e, em seguida, induzidas à oxidação por TBHP. Nota-se que não houve inibição da formação da metahemoglobina por L1. Nas amostras tratadas somente com 9 mmoles/l de L1 não houve formação de metahemoglobina.

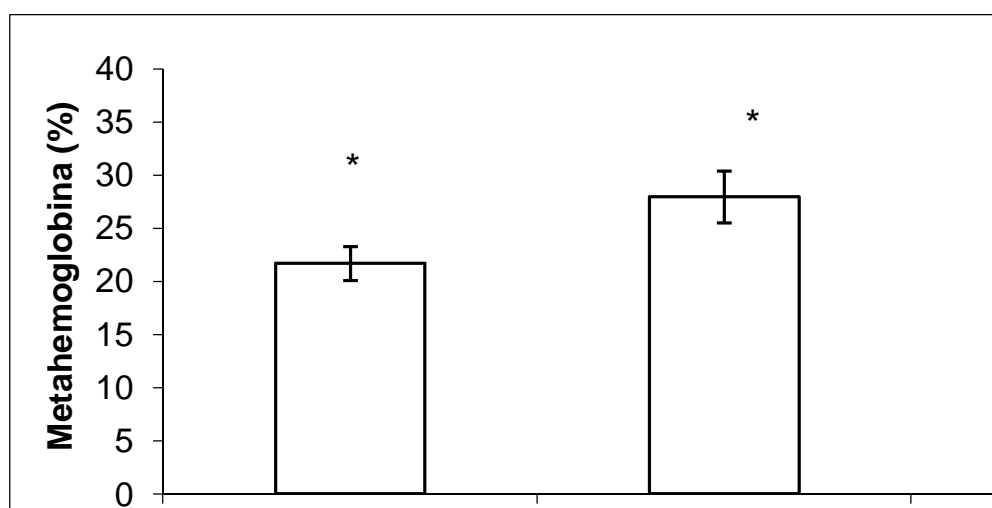
FIGURA 11 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM L1 E POSTERIORMENTE SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP



NOTA: Controle = amostras sem tratamento com L1 e TBHP.  
Incubação com 3 mmoles/l de TBHP, sob homogeneização por 1 h.  
n = 12, a partir de 4 amostras realizadas em triplicata.  
As barras de erro representam os desvios padrão.

A Figura 12 representa a formação de metahemoglobina em tratamentos combinados entre DFX e L1, nas concentrações de 4 mmoles/l e 12 mmoles/l, respectivamente, em três seqüências diferentes. Em seguida, as amostras foram oxidadas por 3 mmoles/l de TBHP.

FIGURA 12 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E L1 E POSTERIORMENTE SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP



NOTAS: \* Diferenças estatísticas entre os três tratamentos (Tukey  $p < 0,05$ )

a - Amostras tratadas com dois quelantes de ferro ao mesmo tempo e em seguida induzidas com 3 mmoles/l de TBHP homogeneizadas por 1 h.

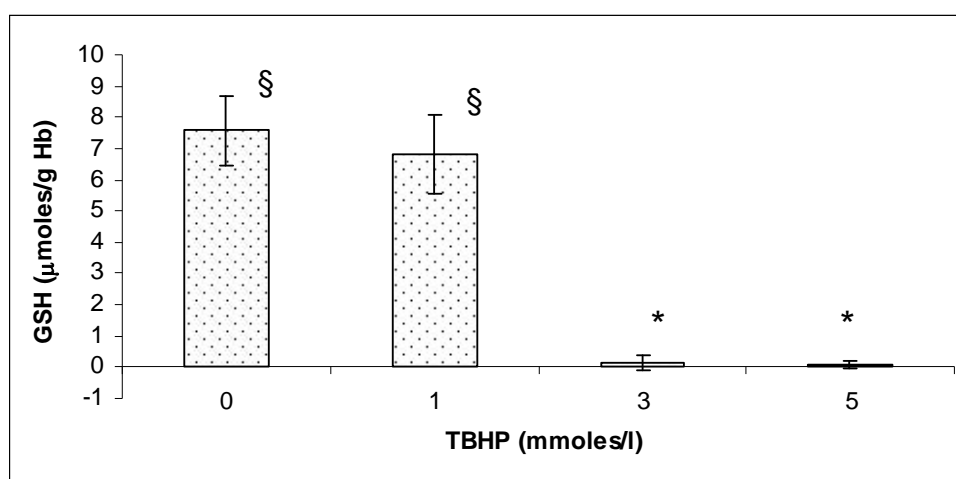
b - Amostras tratadas inicialmente com L1, homogeneizadas por 1 h; tratadas com DFX, homogeneizadas por mais 1 h; e submetidas à oxidação por 3 mmoles/l de TBHP durante 1 h.

c - Amostras tratadas inicialmente com DFX, homogeneizadas por 1 h; tratadas com L1, homogeneizadas por mais 1 h; e submetidas à oxidação por 3 mmoles/l de TBHP durante 1 h.

As barras de erro representam os desvios padrão.

Na Figura 13 estão representadas as concentrações de GSH nas amostras de sangue de indivíduos normais submetidas à oxidação por TBHP nas concentrações de 1 a 5 mmoles/l, e homogeneizadas por 1 h.

FIGURA 13 – CONCENTRAÇÃO DE GSH NOS ERITRÓCITOS NORMAIS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO OXIDANTE DE 1 a 5 mmoles/l DE TBHP



NOTAS: Incubação com TBHP 1, 3 e 5 mmoles/l, sob homogeneização por 1 h.

\* Diferença estatística significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

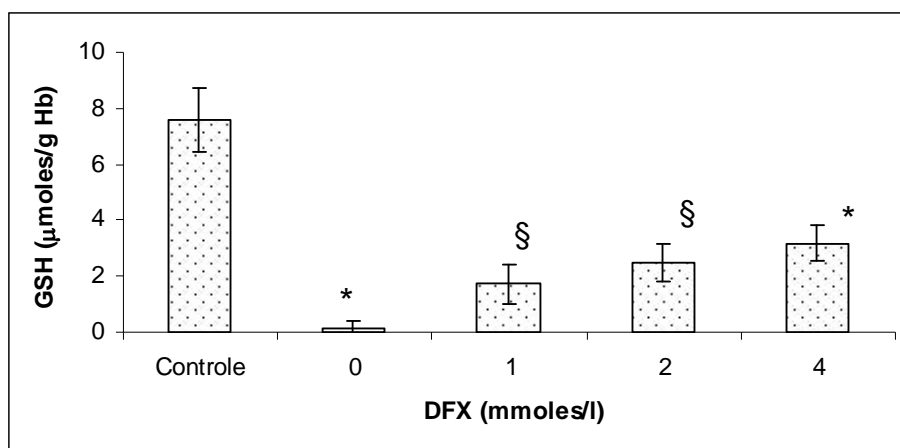
§ Sem diferenças estatísticas entre 0 e 1 mmol/l de TBHP.

n = 12, a partir de 4 amostras repetidas em triplicata.

As barras de erro representam os desvios padrão.

A Figura 14 refere-se às concentrações de GSH nas amostras tratadas com a solução de DFX nas concentrações de 1, 2 e 4 mmoles/l e, posteriormente, induzidas à oxidação por 3 mmoles/l de TBHP. Com o emprego de 4 mmoles/l de DFX, foi observada a recuperação de cerca de 40% de GSH em comparação às amostras tratadas somente com TBHP.

FIGURA 14 – CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E SUBMETIDOS POSTERIORMENTE À OXIDAÇÃO POR TBHP



NOTAS: Controle = amostras tratadas com 4 mmoles/l de DFX.

0 = amostras tratadas com 3 mmoles/l de TBHP, sob homogeneização por 1 h.

DFX na concentração de 1, 2 e 4 mmoles/l sob homogeneização por 1 h, seguida de incubação com 3 mmoles/l de TBHP, sob homogeneização por 1 h.

n = 12, a partir de 4 amostras repetidas em triplicata.

\* Diferença estatística significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

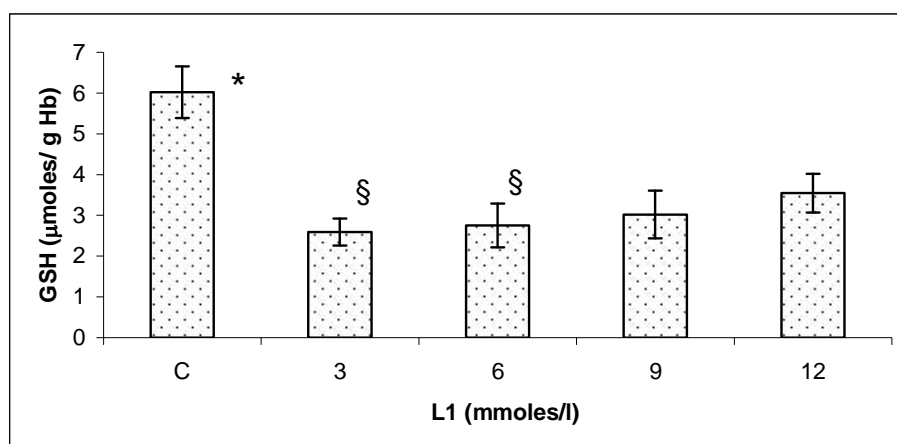
§ Sem diferenças estatísticas entre 1 e 2 mmoles/l.

As barras de erro representam os desvios padrão.



A Figura 15 representa a determinação da concentração de GSH nas amostras pré-tratadas com L1 em concentrações de 3 a 12 mmoles/l e, em seguida, induzidas à oxidação por 3 mmoles/l de TBHP.

FIGURA 15 - CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM L1 E POSTERIORMENTE SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP



NOTAS: C = amostra controle sem adição de L1 e TBHP.

\* Diferenças significativas entre o controle e os demais tratamentos.

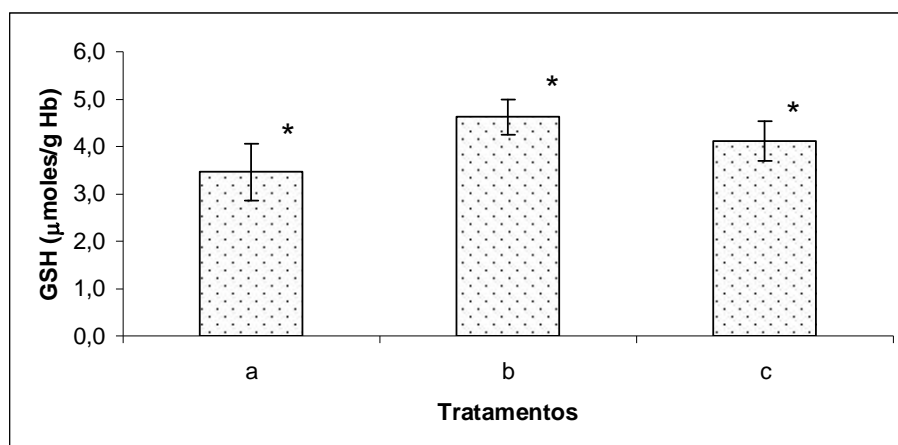
§ Sem diferenças entre mas com diferenças significativas em relação a 12 mmoles/l L1.

n = 12, a partir de 4 amostras repetidas em triplicata.

As barras de erro representam os desvios padrão.

A Figura 16 representa a concentração de GSH em eritrócitos humanos normais tratados com DFX (4 mmoles/l) e L1 (12 mmoles/l) e incubados com TBHP (3 mmoles/l).

FIGURA 16 - CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E L1 E POSTERIORMENTE SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP



NOTAS: \* - Diferenças estatisticamente significativas para todas as comparações (Tukey  $p < 0,05$ ).

a) Amostras tratadas com DFX e L1, homogeneizadas por 1 h e, em seguida, incubadas com TBHP e homogeneizadas por 1 h.

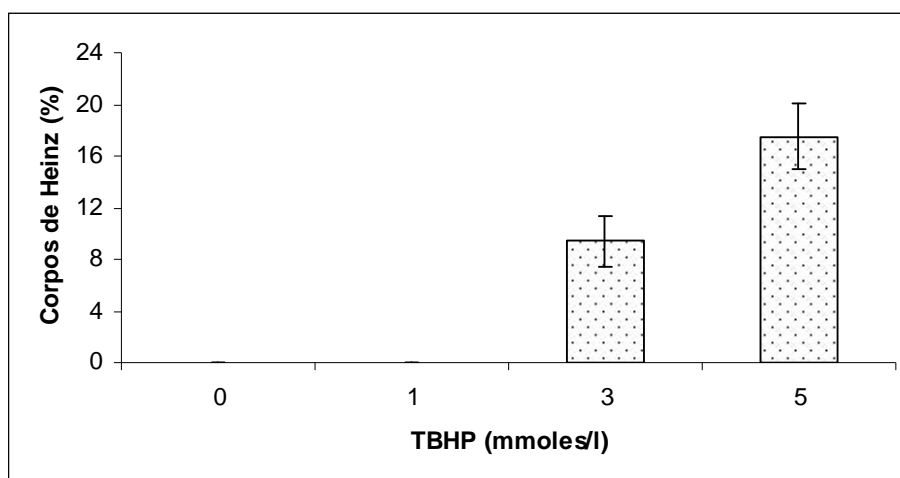
b) Amostras tratadas com L1, homogeneizadas por 1 h; tratadas com DFX, homogeneizadas por mais 1 h e, em seguida, incubadas com 3 mmoles/l de TBHP sob homogeneização durante 1 h.

c) Amostras tratadas com DFX, homogeneizadas por 1 h; tratadas com L1, homogeneizadas por mais 1 h e, em seguida, incubadas com 3 mmoles/l de TBHP sob homogeneização durante 1 h.

As barras de erro representam os desvios padrão.

A Figura 17 mostra a formação de corpos de Heinz em eritrócitos normais tratados somente com oxidante, TBHP, na concentração de 1 a 5 mmoles/l. Na concentração de 5 mmoles/l, houve maior formação de corpos de Heinz, devido ao aumento da oxidação nos eritrócitos.

FIGURA 17 – FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE TBHP



NOTAS: 0 = Amostra controle sem TBHP.

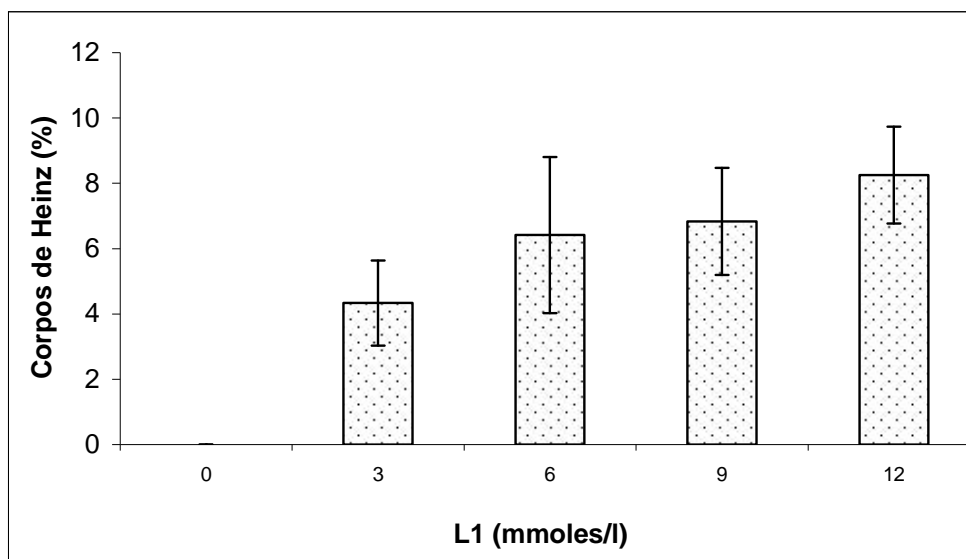
n = 12, a partir de 4 amostras repetidas em triplicata.

As barras de erro representam os desvios padrão.

Nas amostras tratadas com DFX em concentrações de 1, 2 e 4 mmoles/l e oxidadas com 3 mmoles/l de TBHP, não foi observada a presença de corpos de Heinz.

A Figura 18 representa a formação de corpos de Heinz em amostras tratadas com L1, na concentração de 3 a 12 mmoles/l, incubadas com o agente oxidante com 3 mmoles/l de TBHP.

FIGURA 18 – FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM L1 E POSTERIORMENTE SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP



NOTAS: 0 = amostra controle sem tratamento com TBHP e L1.

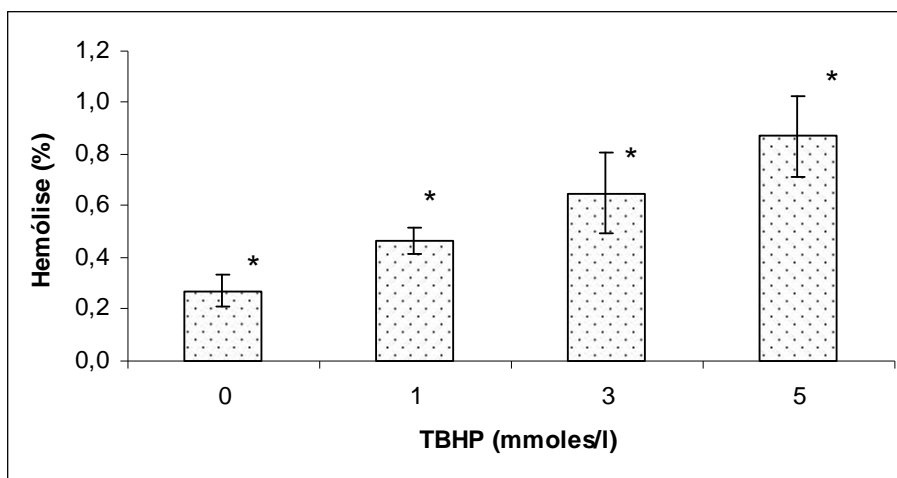
§ - Sem diferenças estatisticamente significativas entre 6 e 9 mmoles/l L1.

n = 12, a partir de 4 amostras repetidas em triplicata.

As barras de erro representam os desvios padrão.

A Figura 19 representa a porcentagem de hemólise em eritrócitos normais submetidos à ação de TBHP nas concentrações de 1 a 5 mmoles/l. A hemólise dos eritrócitos foi diretamente proporcional à concentração do oxidante, sendo que todas as concentrações apresentaram diferenças significativas entre si (Tukey  $p < 0,05$ ).

FIGURA 19 - PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS SUBMETIDOS AÇÃO DE OXIDANTE TBHP



NOTAS: 0 = Amostra controle sem TBHP.

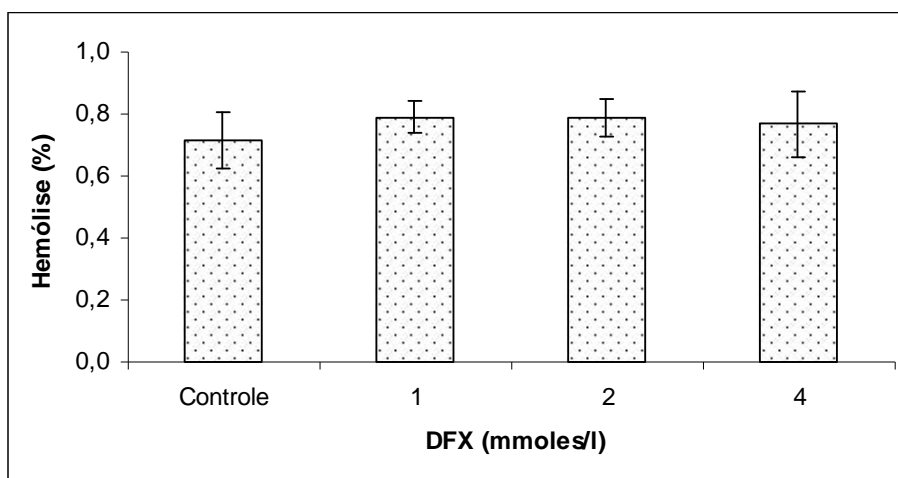
\* Diferença estatisticamente significativa (Tukey  $p < 0,05$ ).

$n = 12$ , a partir de 4 amostras repetidas em triplicata.

As barras de erro representam os desvios padrão.

A Figura 20 representa a porcentagem de hemólise em amostras de eritrócitos normais tratadas com a solução de DFX nas concentrações de 1 a 4 mmoles/l, e oxidadas com 3 mmoles/l de TBHP. Nota-se que não houve nenhuma diferença significativa nas amostras tratadas somente com DFX em comparação com o controle.

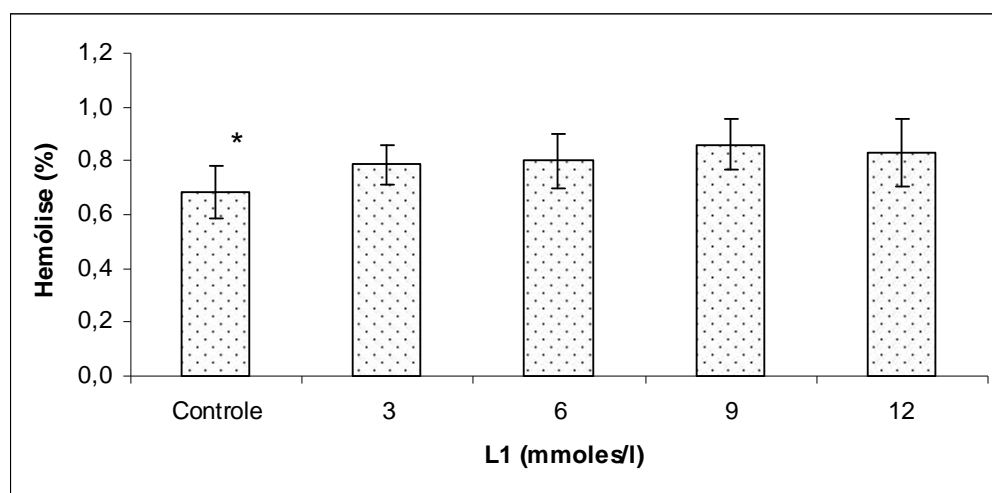
FIGURA 20 – PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E POSTERIORMENTE SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP



NOTAS: Controle = amostra tratada somente com 4 mmoles/l de DFX.  
Não há diferenças estatísticas entre as médias.  
n = 12, a partir de 4 amostras repetidas em triplicata.  
As barras de erro representam os desvios padrão.

A Figura 21 refere-se à porcentagem de hemólise, nas suspensões de eritrócitos tratados com a solução de L1, nas concentrações de 3 a 12 mmoles/l e induzidas à oxidação por TBHP na concentração de 3 mmoles/l, a mesma concentração nas amostras tratadas com DFX. Há diferença significativa na amostra controle tratada somente com L1 em relação às concentrações nas amostras oxidadas.

FIGURA 21 – PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM L1 E POSTERIORMENTE SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP



NOTAS: Controle = amostra tratada somente com 9 mmoles/l de L1.

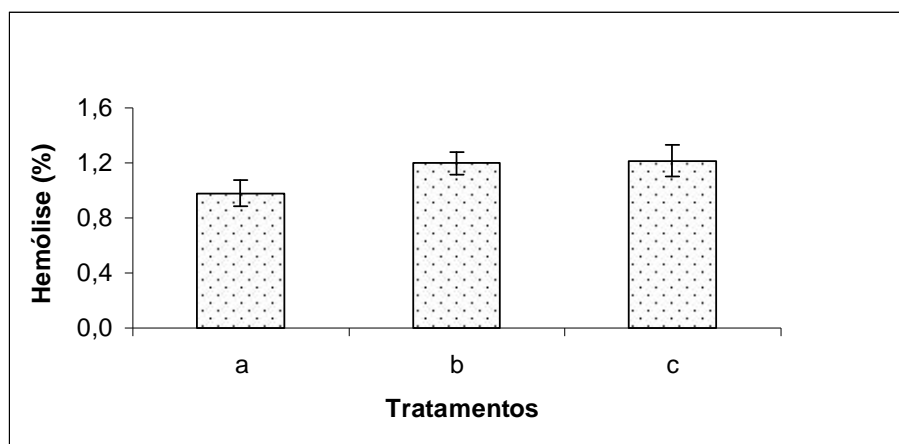
\* Controle estatisticamente diferente das amostras com L1 + TBHP.

n = 12, a partir de 4 amostras realizadas em triplicata.

As barras de erro representam os desvios padrão.

Na Figura 22 está representada a porcentagem de hemólise em eritrócitos, onde foi realizado um tratamento duplo com quelantes, DFX (4 mmoles/l) e L1 (12 mmoles/l), e em seguida oxidado por 3 mmoles/l de TBHP. Os resultados dos experimentos b e c foram estatisticamente diferentes em relação ao experimento a (Tukey  $p < 0,05$ ), sendo que a hemólise foi mais acentuada em comparação com as amostras tratadas individualmente com os quelantes.

**FIGURA 22 – PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E L1 E POSTERIORMENTE SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE DE 3 mmoles/l DE TBHP**



NOTAS: \* Diferenças estatisticamente significativas entre as amostras b e c e a amostra a (Tukey  $p < 0,05$ ).

a) Amostras tratadas com DFX e L1, homogeneizadas por 1 h e, em seguida, incubadas com TBHP e homogeneizadas por 1 h.

b) Amostras tratadas com L1, homogeneizadas por 1 h; tratadas com DFX, homogeneizadas por mais 1 h e, em seguida, incubadas com 3 mmoles/l de TBHP sob homogeneização durante 1 h.

c) Amostras tratadas com DFX, homogeneizadas por 1 h; tratadas com L1, homogeneizadas por mais 1 h e, em seguida, incubadas com 3 mmoles/l de TBHP sob homogeneização durante 1 h.

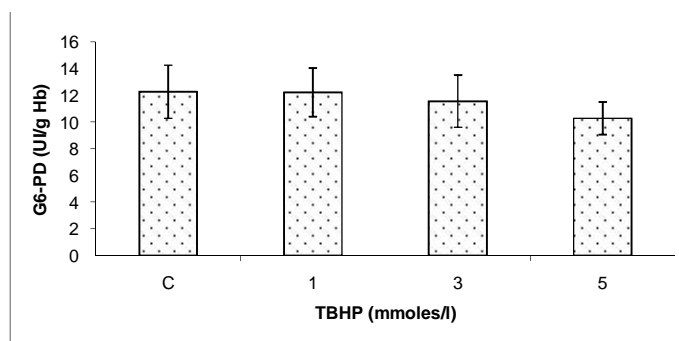
n = 12, sendo 4 amostras analisadas em triplicata.

As barras de erro representam os desvios padrão.



A Figura 23 representa a determinação da atividade enzimática de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6-PD) nas amostras induzidas à oxidação por TBHP nas concentrações de 1 a 5 mmol/L. Não há diferenças significativas entre o controle e as amostras oxidadas.

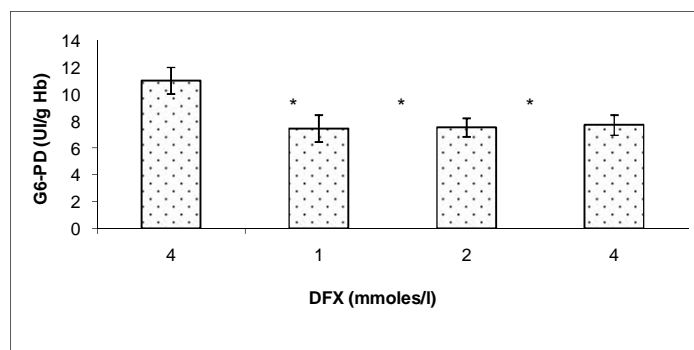
FIGURA 23 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE G6-PD EM ERITRÓCITOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE DE TBHP



NOTAS: C = amostras sem tratamento (controle).  
n = 12, a partir de 4 amostras repetidas em triplicata.  
Não há diferenças estatísticas.  
As barras de erro representam os desvios padrão.

A Figura 24 mostra atividade enzimática de G6-PD em amostras de indivíduos normais tratadas com 1, 2 e 4 mmol/l de DFX e oxidadas com 5 mmol/l de TBHP.

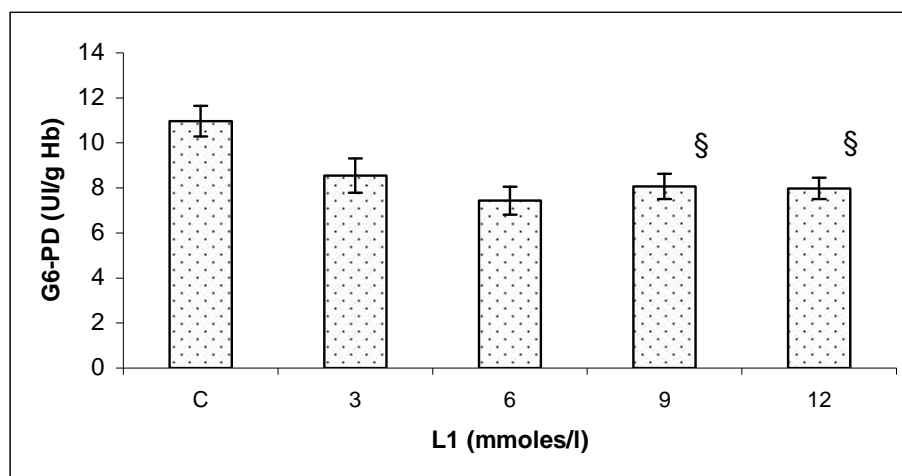
FIGURA 24 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE G6-PD EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM 1, 2 E 4 mmol/l DE DFX E OXIDADOS COM 5 mmol/l DE TBHP



NOTA: \* Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.  
n = 12, a partir de 4 amostras repetidas em triplicata.  
As barras de erro representam os desvios padrão.

A Figura 25 mostra atividades enzimáticas de G6-PD nas amostras de indivíduos normais tratadas com 3 a 12 mmoles/l de L1 e oxidadas com 5 mmoles/l de TBHP.

FIGURA 25 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE G6-PD EM ERITRÓCITOS TRATADOS COM 3, 6, 9 E 12 mmoles/l DE L1 E OXIDADOS COM 5 mmoles/l DE TBHP



NOTA: C = Amostra controle tratada com 9 mmoles/l de L1.

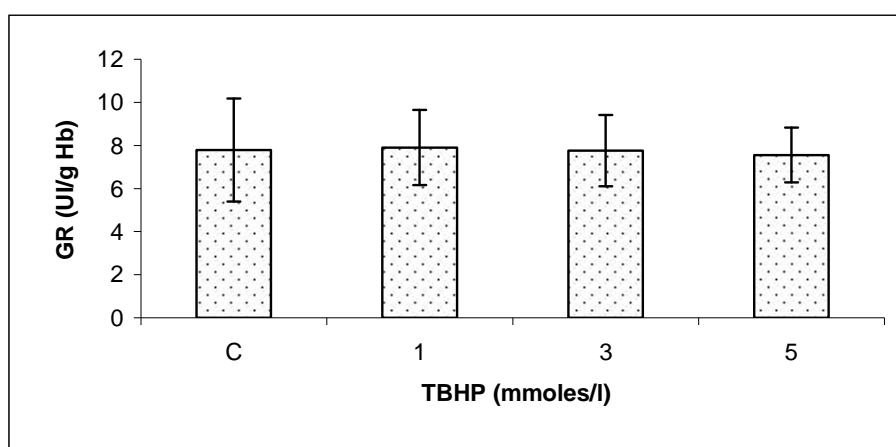
§ Sem diferenças estatísticas entre os tratamentos 9 e 12 mmoles/l L1.

n = 12, a partir de 4 amostras repetidas em triplicata.

As barras de erro representam os desvios padrão.

Na Figura 26 são mostradas as atividades enzimáticas da glutathiona redutase (GR) nos eritrócitos submetidos à ação do oxidante TBHP, nas concentrações de 1 a 5 mmoles/l. As atividades de GR não apresentaram variações significativas nas amostras com tratamentos diferenciados.

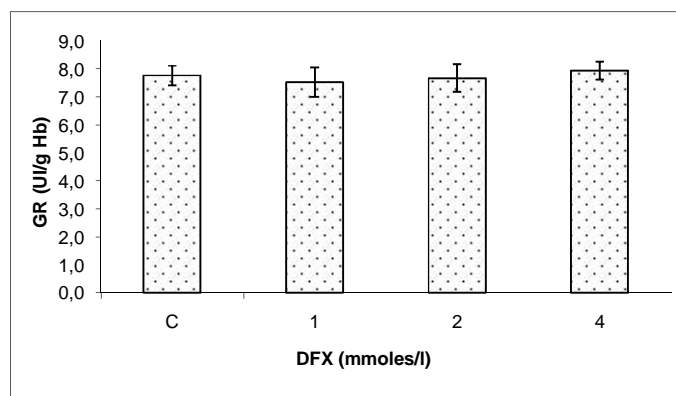
FIGURA 26 – DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE GR EM ERITRÓCITOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE DE TBHP



NOTAS: C = amostras sem tratamento (controle).  
n = 12, a partir de 4 amostras repetidas em triplicata.  
Não há diferenças estatísticas.  
As barras de erro representam os desvios padrão.

A Figura 27 mostra as atividades enzimáticas de GR nas amostras de indivíduos normais tratadas com 1, 2 e 4 mmoles/l de DFX e oxidadas com 5 mmoles/l de TBHP.

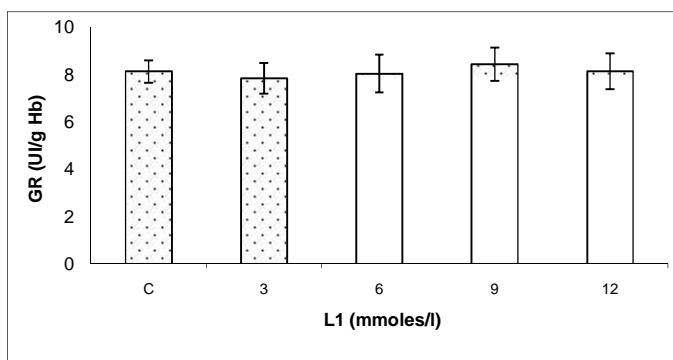
FIGURA 27 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE GR EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM 1, 2 E 4 mmoles/l DE DFX E OXIDADOS COM 5 mmoles/l DE TBHP



NOTAS: C = amostras tratadas somente com 4 mmoles/l de DFX (controle).  
n = 12, a partir de 4 amostras repetidas em triplicata.  
Não há diferenças estatísticas.  
As barras de erro representam os desvios padrão.

A Figura 28 mostra atividade enzimática de GR em amostras de indivíduos normais tratadas com 3, 6, 9 e 12 mmoles/l de L1 e oxidadas com 5 mmoles/l de TBHP.

FIGURA 28 – ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE GR EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM 3, 6, 9 E 12 mmoles/l DE L1 DE E OXIDADOS COM 5 mmoles/l DE TBHP

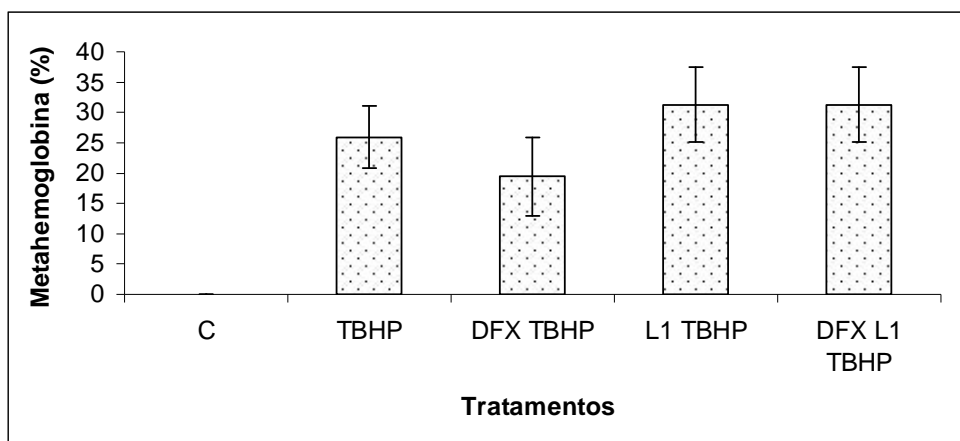


NOTAS: C = amostras tratadas somente com 9 mmoles/l de L1 (controle).  
n = 12, a partir de 4 amostras repetidas em triplicata.  
Não há diferenças estatísticas.  
As barras de erro representam os desvios padrão.

Nas Figuras 29 a 32 estão representados os resultados das amostras de indivíduos portadores de  $\beta$ -talassemia menor (Grupo B).

Na Figura 29 é mostrada a formação de metahemoglobina de eritrócitos de portadores de  $\beta$ -talassemia menor oxidados com 3 mmoles/l de TBHP e as concentrações de metahemoglobina nas amostras tratadas com DFX (4 mmoles/l), L1 (12 mmoles/l) e DFX/L1 (4 mmoles/l e 12 mmoles/l incubados simultaneamente) e posteriormente induzidos à oxidação por 3 mmoles/l de TBHP.

FIGURA 29 – FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS PORTADORES DE  $\beta$ -TALASSEMIA MENOR SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE TBHP



NOTAS: C = amostra controle.

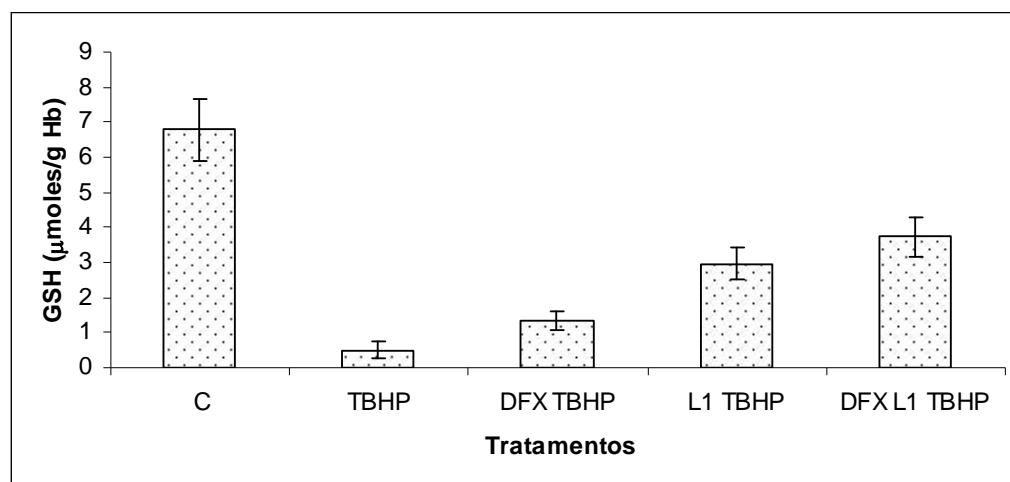
n = 10, a partir de 5 amostras analisadas em duplicata.

\* Diferenças estatisticamente significativas entre as amostras tratadas com DFX/TBHP com as de L1/TBHP e DFX/L1/TBHP.

As barras de erro representam os desvios padrão.

Na Figura 30 é representada a concentração de GSH, no qual os eritrócitos dos portadores de  $\beta$ -talassemia menor foram tratados com DFX e L1 e, posteriormente, induzidos à oxidação com 3 mmoles/l de TBHP.

FIGURA 30 – CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS DE PORTADORES DE  $\beta$ -TALASSEMIA MENOR SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM DFX (4 mmoles/l); L1 (12 mmoles/l) E DFX/L1 (4 mmoles/l / 12 mmoles/l) E, POSTERIORMENTE, SUBMETIDOS AO OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP



NOTAS: C = amostra controle.

Todos os tratamentos são estatisticamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).

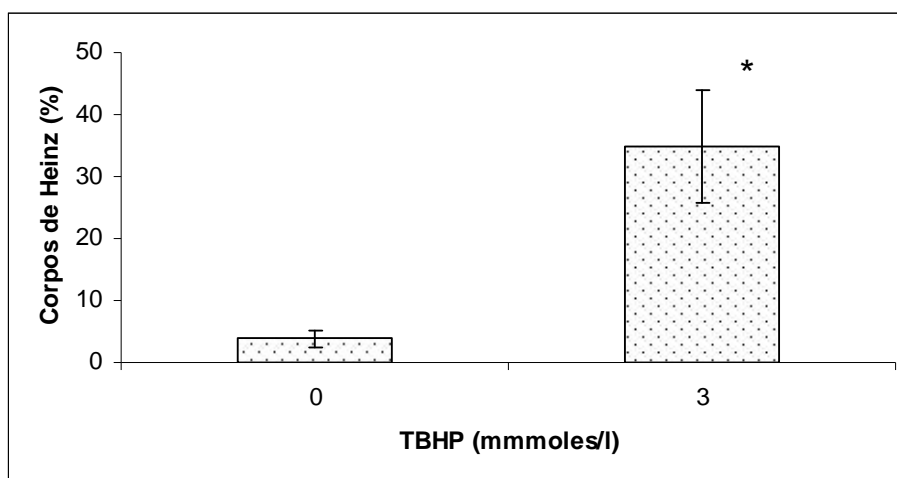
$n = 10$ , a partir de 5 amostras repetidas em duplicata.

As barras de erro representam os desvios padrão.



A Figura 31 representa a porcentagem de corpos de Heinz em eritrócitos de portadores de  $\beta$ -talassemia menor tratados com 3 mmoles/l de TBHP.

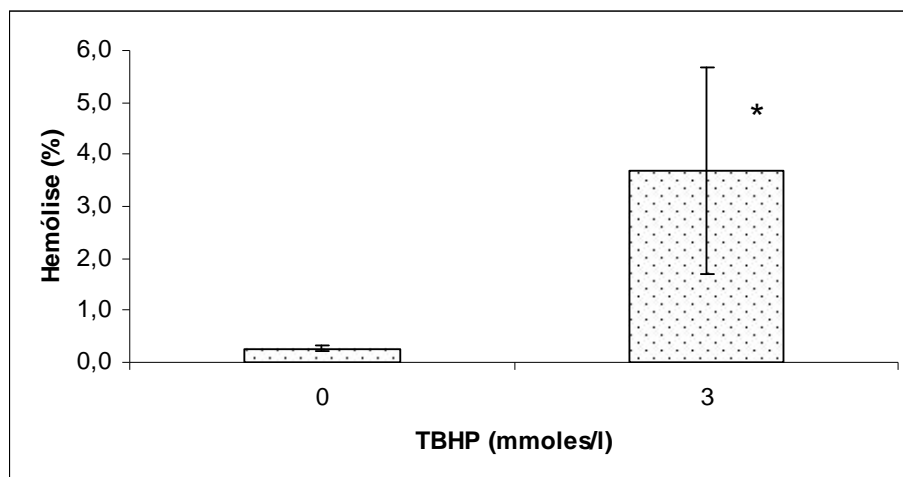
FIGURA 31 – FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM SUSPENSÕES DE ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE  $\beta$ -TALASSEMIA MENOR SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP



NOTAS: \* Diferença significativa em relação ao controle (anova  $p < 0,05$ ).  
n = 10, a partir de 5 amostras repetidas em duplicata.  
As barras de erro representam os desvios padrão.

A Figura 32 representa a porcentagem de hemólise em eritrócitos de portadores de  $\beta$ -talassemia menor tratados com 3 mmoles/l de TBHP.

FIGURA 32 - PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS DE PORTADORES DE  $\beta$ -TALASSEMIA MENOR SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE TBHP

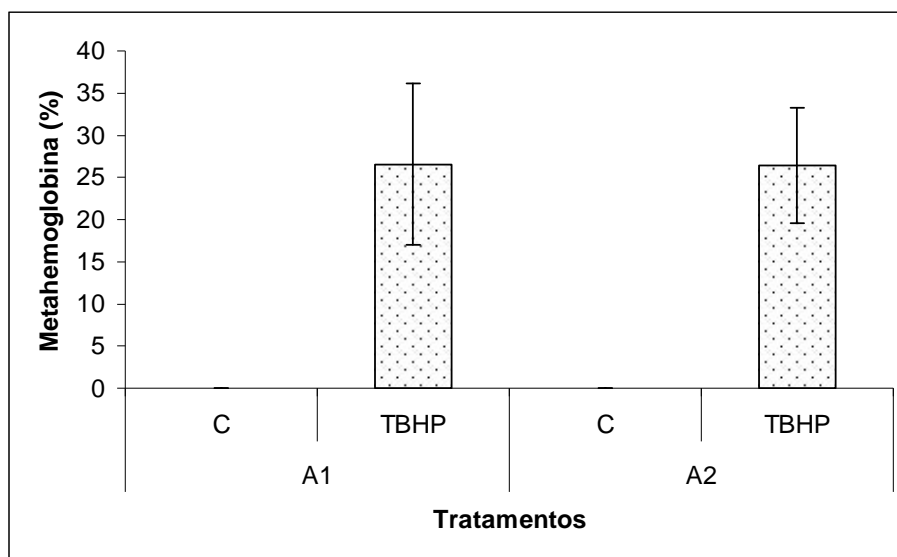


NOTAS: \* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (Anova  $p < 0,05$ ).  
n = 10, a partir de 5 amostras repetidas em duplicata.  
As barras de erro representam os desvios padrão.

As Figuras 33 a 36 representam os resultados das amostras de pacientes portadores de  $\beta$ -talassemia maior.

Na Figura 33 é mostrada a formação de metahemoglobina em eritrócitos induzidos à oxidação de 3 mmoles/l de TBHP. As amostras estão divididas em dois grupos, conforme o tratamento recebido pelos pacientes, de acordo com os grupos A1 – pacientes tratados com DFX e L1; e A2 – pacientes tratados com DFX.

FIGURA 33 – FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS DE PACIENTES PORTADORES DE  $\beta$ -TALASSEMIA MAIOR, SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l de TBHP



NOTAS: Controle A1: Amostras de pacientes sob tratamento com DFX e L1.

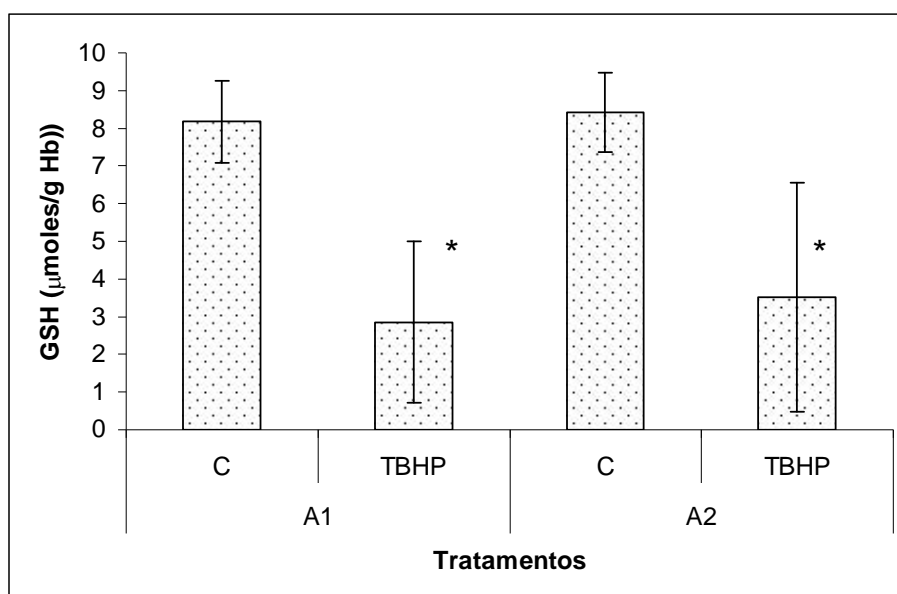
Controle A2: Amostras de pacientes sob tratamento com DFX

n = 20, sendo amostras A1, com DFX e L1 (n = 14); e A2, com DFX (n = 6), analisadas em duplicata.

As barras de erro representam os desvios padrão.

Na Figura 34 está representada a concentração de GSH em eritrócitos dos pacientes portadores de  $\beta$ -talassemia maior submetidos à ação de 3 mmoles/l de TBHP.

FIGURA 34 – CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS DE PACIENTES PORTADORES DE  $\beta$ -TALASSEMIA MAIOR, SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP



NOTAS: Controle A1: Amostras de pacientes sob tratamento com DFX e L1.

Controle A2: Amostras de pacientes sob tratamento com DFX

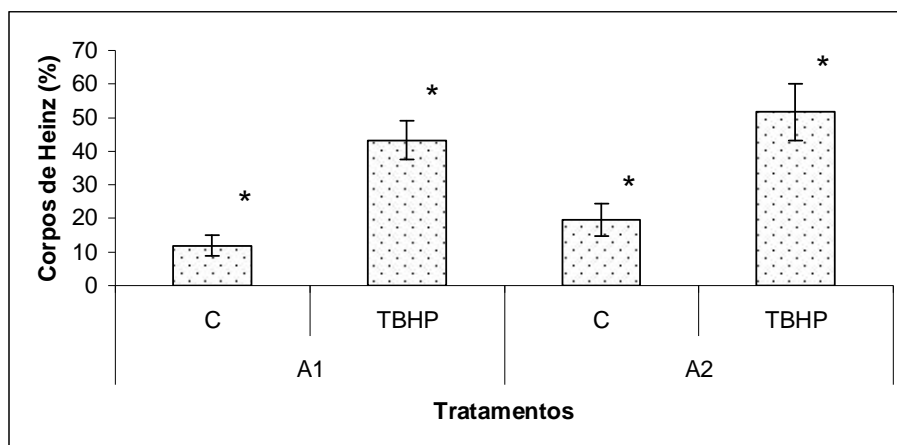
n = 20, sendo amostras A1, com DFX e L1 (n = 14); e A2, com DFX (n = 6), analisadas em duplicata.

As barras de erro representam os desvios padrão.

\* Diferenças estatisticamente significativas com os controles.

A Figura 35 representa a incidência de formação de corpos de Heinz em amostras de pacientes portadores de  $\beta$ -talassemia maior submetidas à oxidação por 3 mmoles/l de TBHP.

FIGURA 35 – FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM AMOSTRAS DE PACIENTES PORTADORES DE  $\beta$ -TALASSEMIA MAIOR SUBMETIDAS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP



NOTAS: Controle A1: Amostras de pacientes sob tratamento com DFX e L1.

Controle A2: Amostras de pacientes sob tratamento com DFX

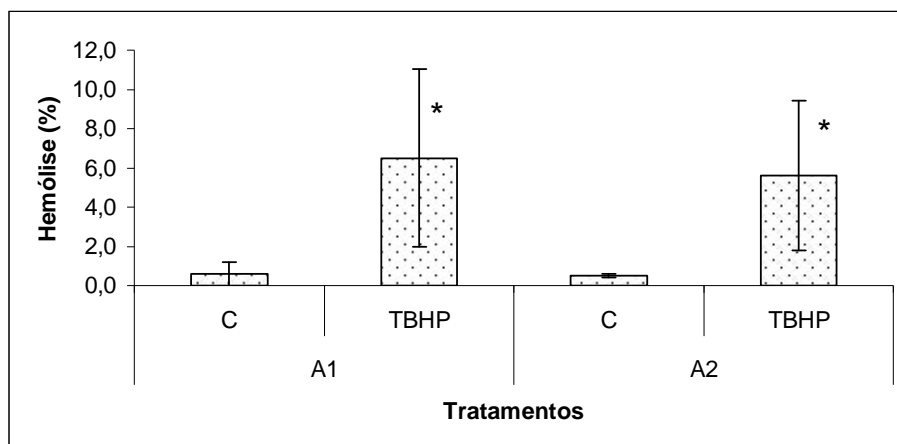
n = 20, sendo amostras A1, com DFX e L1 (n = 14); e A2, com DFX (n = 6), analisadas em duplicata.

As barras de erro representam os desvios padrão.

\* Diferenças estatisticamente significativas para todas as comparações (Tukey  $p < 0,05$ )

A Figura 36 representa a porcentagem de hemólise dos eritrócitos de pacientes portadores de  $\beta$ -talassemia maior, oxidados com 3 mmoles/l de TBHP.

FIGURA 36 – PORCENTAGEM DE HEMÓLISE DOS ERITRÓCITOS DE PACIENTES DE  $\beta$ -TALASSEMIA MAIOR SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 3 mmoles/l DE TBHP



NOTAS: Controle A1: Amostras de pacientes sob tratamento com DFX e L1.

Controle A2: Amostras de pacientes sob tratamento com DFX

n = 20, sendo amostras A1, com DFX e L1 (n = 14); e A2, com DFX (n = 6), analisadas em duplicata.

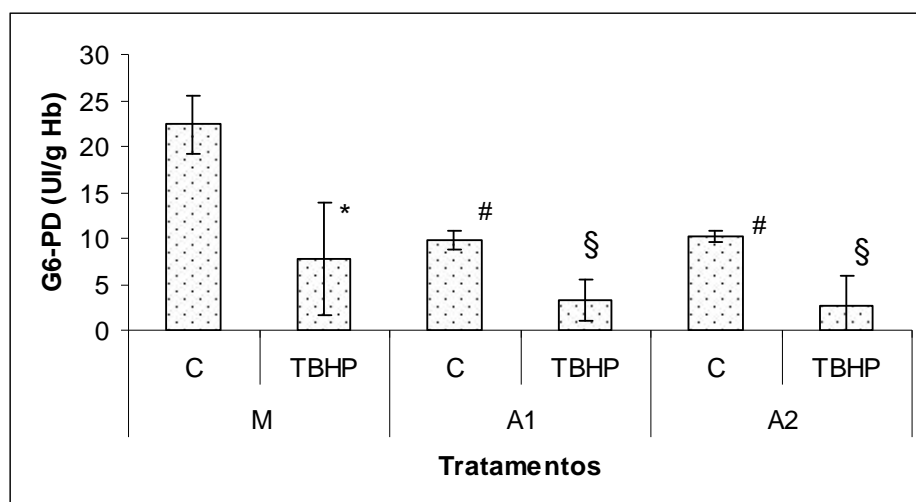
\* Diferença estatisticamente significativa em relação aos controles (Tukey  $p < 0,05$ )

As barras de erro representam os desvios padrão.

As Figuras 37 e 38 representam os resultados das amostras de indivíduos portadores de  $\beta$ -talassemia menor (Grupo B) e maior (Grupo A).

A Figura 37 mostra a atividade enzimática de G6-PD dos eritrócitos oxidados com 5 moles/l de TBHP.

FIGURA 37 – ATIVIDADES ENZIMÁTICAS G6-PD EM ERITRÓCITOS DE PACIENTES PORTADORES DE  $\beta$ -TALASSEMIA SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 5 mmoles/l DE TBHP



NOTAS: Teste de Tukey: \* estatisticamente diferente do controle normal;

§ estatisticamente idênticos entre si, e diferente da amostra M;

# estatisticamente diferentes do controle M

Controle B: Amostras controle –  $\beta$ -talassemia menor

Controle A1: Amostras contendo DFX e L1.

Controle A2: Amostras contendo somente DFX.

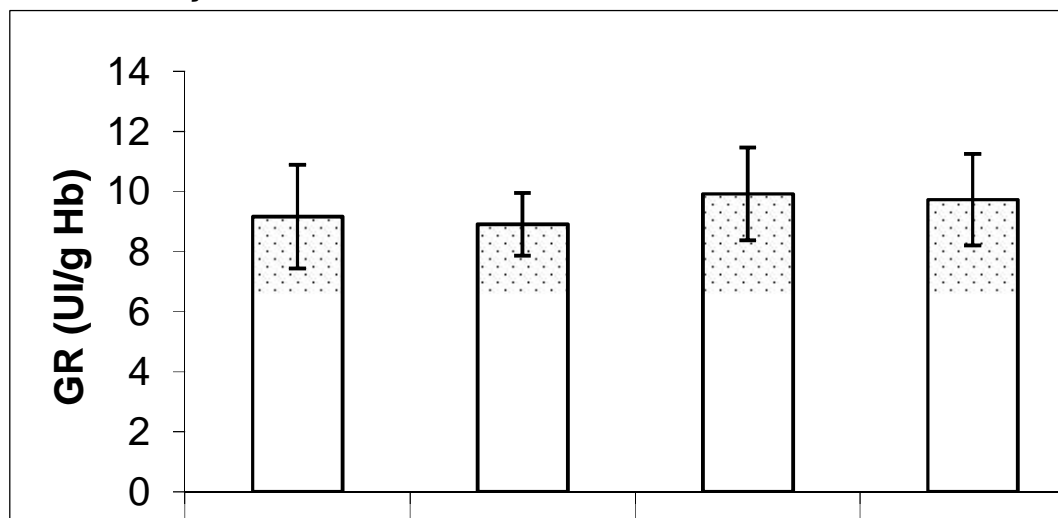
n = 30, sendo 10 amostras repetidas em duplicata em  $\beta$ -talassemia maior, DFX e L1 (n = 14); só DFX (n = 6). Para  $\beta$ -talassemia menor, 5 amostras repetidas em duplicata.

\* Diferenças estatisticamente significativas com os controles

As barras de erro representam os desvios padrão.

A Figura 38 mostra as atividades enzimáticas de GR em eritrócitos submetidos à ação do oxidante de 5 mmoles/l de TBHP.

FIGURA 38 – ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE GR EM ERITRÓCITOS DE PACIENTES PORTADORES DE  $\beta$ -TALASSEMIA SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE COM 5 mmoles/l DE TBHP



NOTAS: Controle B: Amostra controle de  $\beta$ -talassemia menor

Controle A1: Amostras contendo DFX e L1.

Controle A2: Amostras contendo somente DFX.

n = 30, sendo 10 amostras repetidas em duplicata para  $\beta$ -talassemia maior com DFX e L1 (n = 14); só DFX (n = 6). Para  $\beta$ -talassemia menor, 5 amostras repetidas em duplicata.

Não há diferenças estatisticamente significantes entre as médias.

As barras de erro representam os desvios padrão.



A Tabela 2 ilustra, comparativamente, os resultados obtidos para os grupos normais e portadores de talassemia.

**TABELA 2. AÇÃO PRÓ-OXIDANTE DO TBHP E ANTIOXIDANTE DA DESFEROXAMINA E DEFERIPRONA EM ERITRÓCITOS NORMAIS E DE PORTADORES DE  $\beta$ -TALASSEMIA MENOR E  $\beta$ -TALASSEMIA MAIOR**

| Células vermelhas                   | Análises       | MetHb       | GSH         | Hemólise    | Corpos de Heinz | G6-PD        | GR          |
|-------------------------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|--------------|-------------|
| Normal (Grupo C)                    | Sem tratamento | 0           | 7,5         | 0,21        | 0               | 12,27        | 7,79        |
|                                     | TBHP           | 20          | 0,15        | 0,65        | 9               | 10,27        | 7,55        |
|                                     | DFX            | 3,2         | 3,1         | 0,79        | 0               | 7,71         | 7,94        |
|                                     | L1             | 32,8        | 3,5         | 0,82        | 6,8             | 7,97         | 8,12        |
|                                     | DFX + L1       | 21,6        | 4,62        | 0,98        | *               | *            | *           |
| $\beta$ -Talassemia Menor (Grupo B) | Sem tratamento | 0           | 6,79        | 0,26        | 5               | 22,36        | 9,16        |
|                                     | TBHP           | 26,5        | 0,5         | 2,74        | 34              | 7,74         | 8,91        |
|                                     | DFX            | 19,4        | 1,34        | *           | *               | *            | *           |
|                                     | L1             | 25,9        | 2,97        | *           | *               | *            | *           |
|                                     | DFX + L1       | 31,2        | 3,74        | *           | *               | *            | *           |
| $\beta$ -Talassemia Maior (Grupo A) | Sem tratamento | 0           | 8,17 - 8,41 | 0,52 - 0,57 | 10              | 9,76 - 10,22 | 9,44 - 9,92 |
|                                     | TBHP           | 26,4 - 26,5 | 2,85 - 3,51 | 5,60 - 6,49 | 43 - 51         | 2,71 - 3,33  | 9,47 - 9,73 |

NOTAS: As amostras tratadas com quelantes de ferro isoladas ou em conjunto foram oxidadas com 3 mmoles/l de TBHP para as determinações de metahemoglobina, GSH, porcentagem de hemólise e Corpos de Heinz; e 5 mmoles/l de TBHP para as determinações enzimáticas.

\* - não determinado.

Unidades aplicadas: MetHb (%); GSH ( $\mu$ moles/l); Hemólise (%); Corpos de Heinz (%); G6-PD (UI/g de Hb); GR (UI/g de Hb).

## 6. DISCUSSÃO

Na análise da ação de quelantes de ferro sobre os eritrócitos, foi observada uma proteção contra a oxidação do ferro presente na hemoglobina por DFX e L1, através dos parâmetros oxidativos testados, que são indícios das alterações e desequilíbrios eritrocitários. A DFX e L1 são utilizadas no tratamento de indivíduos  $\beta$ -talassêmicos maior na remoção do ferro corporal em excesso (FAA & CRISPONI, 1999; LIU et al., 2002; KATTAMIS et al., 2006).

O meio escolhido para a manutenção dos eritrócitos foi de 150 mmoles/l de tampão fosfato e 154 mmoles/l de NaCl, pH 7,4, para mantê-los em condições metabólicas satisfatórias. O volume globular das suspensões de eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes talassêmicos foi mantido em aproximadamente 40%, para padronização das condições de reação dos ensaios.

A partir de solução-mãe de 50 mmoles/l de TBHP em 67 mmoles/l de tampão fosfato com 200 mg/dl de glicose, pH 7,6, foi possível adicionar o oxidante às suspensões de eritrócitos em pequenos volumes, evitando-se possíveis alterações no tamponamento ou mesmo no volume globular.

Estudos prévios no laboratório já haviam comprovado a ação oxidativa por TBHP (COMAR, 2002; KRUKOSKI, 2006; CHAVES, 2007). Existem diversas publicações sobre a ação oxidante de TBHP em eritrócitos. Entre as alterações associadas ao TBHP, aponta-se: desequilíbrio da homeostase do cálcio intracelular; oxidação da glutathione reduzida e das proteínas tiol da célula; quebra da cadeia de DNA; peroxidação lipídica e diminuição da mobilidade intraglobular das proteínas da membrana (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Neste trabalho, observou-se a formação de metahemoglobina por ação de TBHP, a qual aumenta proporcionalmente ao aumento da concentração do oxidante (Figura 9). Da mesma forma, observou-se outros efeitos em função da concentração do TBHP, entre eles, a diminuição da concentração de GSH, o aumento da formação de corpos de Heinz e o aumento dos índices de hemólise e a diminuição da concentração de GSH (Figuras 13, 17 e 19). DOMANSKI et al. (2004) analisaram, por quimioluminescência, o aumento dos radicais livres nas células vermelhas oxidadas com TBHP, concluindo que o mesmo promove a oxidação de GSH e da oxihemoglobina, favorecendo a peroxidação lipídica. Esses autores verificaram

acúmulo de metahemoglobina e elevada peroxidação lipídica, medida através da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com o aumento da concentração do oxidante.

Neste trabalho, observou-se a depleção de GSH por ação do TBHP nas concentrações de 1 a 5 mmoles/l, como mostra a Figura 13. COMAR (2002) observou a redução de cerca de 50% de GSH em eritrócitos por ação de 0,5 mmol/l de TBHP; enquanto. KRUKOSKI (2006) verificou diminuição de GSH em comparação ao controle a partir de 1 mmol/l de TBHP, com depleção total na presença de 4 mmoles/l de TBHP.

### **6.1 Grupo C – Indivíduos normais**

A DFX mostrou um efeito protetor contra a ação oxidante do TBHP (Figura 10) pela formação de apenas 4% de metahemoglobina, contra cerca de 22 % formados no caso das amostras tratadas somente com TBHP. COMAR (2002) com 4 mmoles/l de desferoxamina e 5 mmoles/l de TBHP, não verificou o efeito protetor contra a oxidação da hemoglobina. No entanto, RICE-EVANS et al. (1989) já haviam observado esse efeito, o que foi confirmado por KRUKOSKI (2006), ao verificar a inibição da formação de metahemoglobina em amostras contendo DFX de 1 a 4 mmoles/l com 5 mmoles/l de TBHP.

Ao contrário da DFX, a L1 não protegeu os eritrócitos, sugerindo um efeito pró-oxidante, com índices de formação de metahemoglobina superiores a 25% para todas as concentrações de L1 testadas (Figura 11). RICE-EVANS et al. (1989) realizaram estudos sobre a interação de DFX e derivados do grupo de hidroxipiridonas (ao qual pertence a L1) com os componentes da hemoglobina, constatando que a DFX e certos derivados de hidroxipiridona preveniram a oxidação da hemoglobina intracelular após estresse oxidativo na presença de ferro. Igualmente, um derivado deste grupo, 3-hidroxipiridina-2-ona (CP02), o qual difere da L1 pela presença do radical etila no lugar de um radical metila, ao contrário, favoreceu a produção de metahemoglobina.

Com o objetivo de verificar um possível sinergismo entre DFX e L1, testou-se a ação conjunta dos dois quelantes de ferro sobre os eritrócitos. Ao adicionar a DFX e L1 ao mesmo tempo, a formação de metahemoglobina foi menor se comparada aos tratamentos onde se adicionou os quelantes isoladamente, em tempos

diferentes (Figura 12). COMAR (2002) analisou nas suspensões em eritrócitos pré-incubadas com 100  $\mu$ moles/l de rutina e mesilato de desferoxamina (4 mmoles/l) e incubadas com 5 mmoles/l de TBHP; e verificou o efeito sinérgico entre os dois compostos pela diminuição da formação de metahemoglobina, em relação às amostras incubadas apenas com 5 mmoles/l de TBHP; sendo que, de forma isolada, estes compostos não protegeram os eritrócitos contra a formação de metahemoglobina.

Ao se testar a ação da DFX e da L1 na oxidação de GSH por 3 mmoles/l de TBHP notou-se que, a recuperação de GSH melhora em função da concentração do quelante de ferro (Figuras 14 e 15, respectivamente). Na concentração de 4 mmoles/l de DFX, há recuperação de cerca de 40% de GSH. KRUKOSKI (2006) verificou perda mínima de GSH em amostras de eritrócitos pré-tratadas com 1 a 4 mmoles/l de DFX e induzidas à oxidação por 1 mmol/l de TBHP, não havendo recuperação proporcional de GSH de acordo com a concentração de DFX.

Em experimentos de EYBL et al. (2002) em camundongos que receberam uma dieta enriquecida com ferro e, em seguida, foram tratados com DFX e L1, comprovou-se a eficácia dos quelantes de ferro através da redução da produção de malonilaldeído (MDA) e da elevação da glutatona reduzida no tecido hepático, em comparação a um grupo controle.

O efeito conjunto dos quelantes de ferro mostrou-se significativo nas amostras onde foi adicionada primeiramente a L1 e posteriormente a DFX (Figura 16- tratamento b), seguidas de oxidação por TBHP, onde se verifica uma recuperação maior da GSH em comparação com as amostras tratadas com um dos quelantes. Segundo BREUER et al. (2000), a L1 remove o ferro das células, podendo este ser transferido para a DFX, permitindo a regeneração de L1.

A formação de corpos de Heinz, na presença de 3 mmoles/l de TBHP, foi de 9% (Figura 17), indício de que a hemoglobina foi oxidada, fato comprovado pela formação de 20% de metahemoglobina (Figura 9). A DFX, em concentrações a partir de 1 mmol/l, preveniu a formação de corpos de Heinz em eritrócitos incubados com 3 mmoles/l de TBHP. No entanto, a L1 não inibiu a formação de corpos de Heinz (Figura 18), dados reforçados pela elevação na concentração de metahemoglobina (Figura 11). COMAR (2002) observou a presença de corpos de Heinz em suspensões de eritrócitos humanos tratados com 1 a 5 mmoles/l de DFX, submetidos à ação de 3 mmoles/l de TBHP, com diminuição na formação de corpos

de Heinz em função do aumento da concentração de DFX. CLARO et al. (2006) observaram um aumento da formação de corpos de Heinz em até quase 100% dos eritrócitos, proporcional à concentração de fenilhidrazina (0,3 a 5 mmoles/l).

A hemólise induzida por TBHP foi proporcional ao aumento da concentração do oxidante de 1 a 5 mmoles/l (Figura 19). As amostras tratadas com os quelantes de ferro não apresentaram proteção contra a hemólise (Figura 20 e 22). Nas amostras tratadas com os dois quelantes de ferro em conjunto e incubados com 3 mmoles/l de TBHP, a hemólise foi significativamente maior se comparada às amostras tratadas individualmente. A L1, por ter tamanho molecular menor que a DFX, entra mais facilmente nas células (BERNHARDT, 2007).

CHAVES (2007) determinou a porcentagem de hemólise induzida por 2 mmoles/l de TBHP em eritrócitos normais, obtendo valores da ordem de 1%, que se reduziram na presença de vitamina E ou vitamina C + E, mas, por outro lado, aumentaram com a adição de vitamina C isolada. Esses resultados mostram que um agente antioxidante pode, de acordo com as condições dadas e a forma de se avaliar o processo, apresentar efeito pró-oxidante. Deve-se refletir a respeito da ação antioxidante das vitaminas C e E como doadores de elétrons, enquanto os quelantes de ferro podem levar à diminuição do processo oxidativo pela sua capacidade de retirar do meio uma potencial fonte geradora de radicais livres, o íon ferro.

A oxidação dos eritrócitos com TBHP e a sua possível ação sobre as enzimas, glicose 6-fosfato desidrogenase (G6-PD) e glutathione redutase (GR) pode ser verificada nas Figuras 23 e 26, respectivamente. Nas concentrações de 1 a 5 mmoles/l de TBHP, a atividade de GR manteve-se constante. A atividade de G6-PD apresentou uma ligeira diminuição, apenas na presença de 5 mmoles/l de TBHP. Esta mesma concentração foi utilizada em amostras tratadas com a DFX e L1 para verificar uma possível proteção das atividades enzimáticas, como se pode observar nas Figuras 24 e 25, respectivamente. Nota-se que não houve a proteção das enzimas G6-PD por quelantes de ferro contra a oxidação por TBHP.

## 6.2 Grupo B – Indivíduos portadores de $\beta$ -talassemia menor

Os eritrócitos das amostras do Grupo B se mostraram mais sensíveis à ação do TBHP, com a formação de metahemoglobina em valores superiores a 25% (Figura 29). Nas amostras tratadas com quelantes de ferro e submetidas à oxidação por 3 mmoles/l de TBHP, os valores de metahemoglobina foram igualmente elevados, sendo que apenas o tratamento com DFX isoladamente, mostrou algum efeito inibidor na formação da metahemoglobina, com valores médios de 19%.

Os eritrócitos do grupo B, quando tratados com 3 mmoles/l de TBHP, tiveram a concentração de GSH praticamente exaurida, como se pode observar na Figura 30. A incubação com os quelantes de ferro levou a uma proteção parcial da GSH, sendo em menor proporção no caso da DFX, de cerca de 50% no caso da L1 e em valores ainda maiores para o tratamento conjunto com os dois quelantes ao mesmo tempo. Observou-se diferenças significativas entre os três tratamentos.

Embora em geral os indivíduos portadores de  $\beta$ -talassemia menor não apresentem anemia ou apresentem apenas anemia discreta, podem ser evidenciadas algumas alterações, entre elas a presença de corpos de Heinz, mostrando uma tendência à oxidação exacerbada. Neste trabalho, observou-se a formação de cerca de 5% de corpos de Heinz em amostras controle e, quando estas foram tratadas com 3 mmoles/l de TBHP, a média foi de 38% (Figura 31). A hemólise também foi acentuada no tratamento das amostras com TBHP (Figura 32).

As atividades de G6-PD foram elevadas nos eritrócitos dos  $\beta$ -talassêmicos menor (Figura 37). Possíveis explicações para este fato poderiam estar relacionadas com alterações metabólicas destinadas à manutenção do equilíbrio funcional dos eritrócitos. O oxidante TBHP não mostrou nenhuma ação contra a enzima GR, sendo que suas atividades se mantiveram constantes sob estresse oxidativo (Figura 38).

NAOUM et al. (2006), no estudo do perfil oxidativo de indivíduos portadores de  $\beta$ -talassemia menor, observaram: elevadas atividades de superóxido dismutase ( $989,3 \pm 396,5$  UI/g Hb), aproximadamente o dobro em relação ao normal ( $466,2 \pm 146,6$  UI/g Hb); metahemoglobina de  $3,36 \pm 0,74\%$ , 77% maior que a de eritrócitos normais; e porcentagem de corpos de Heinz elevada, com  $0,01 \pm 0,007\%$ , em relação a  $0,004 \pm 0,006\%$  em eritrócitos normais. Os autores concluíram que a metahemoglobina é um marcador sensível da toxicidade molecular e que a enzima

superóxido dismutase revela a intensidade do estado oxidativo do processo, em um esforço biológico intra-eritrocitário para a manutenção do equilíbrio antioxidativo.

### **6.3 Grupo A – Indivíduos portadores de $\beta$ -talassemia maior**

Na  $\beta$ -talassemia maior, a anemia severa e as transfusões sanguíneas freqüentes favorecem o estresse oxidativo nos eritrócitos. A concentração de metahemoglobina encontrada foi superior a 25% quando os eritrócitos foram submetidos ao tratamento com 3 mmoles/l de TBHP. Apesar de todos os pacientes em estudo estarem sob tratamento com os quelantes de ferro, não foi verificada redução na concentração de metahemoglobina (Figura 33).

Diferentemente dos resultados obtidos para metahemoglobina, a GSH pareceu estar parcialmente protegida da ação de 3 mmoles/l de TBHP (Figura 34). Pode-se inferir, a partir dos valores de GSH em eritrócitos de pacientes tratados com DFX ou DFX e L1, que estes quelantes de ferro poderiam auxiliar o organismo a diminuir o processo oxidativo responsável por uma parte dos mecanismos patológicos inerentes à sua condição.

A formação de corpos de Heinz nas amostras dos indivíduos do Grupo A foi mais sensível à oxidação por TBHP, apresentando valores de cerca de 40% (Figura 35). A hemólise foi acentuada em dois grupos de tratamento com quelantes de ferro quando estas eram submetidas à oxidação por TBHP (Figura 36).

As atividades de GR encontradas em eritrócitos dos portadores de  $\beta$ -talassemia maior foram superiores às de indivíduos não portadores de doenças hemolíticas e se mantiveram inalteradas, independentemente do tratamento dos pacientes ou da adição de TBHP (Figura 38).

As atividades de GR e G6-PD costumam ser elevadas em  $\beta$ -talassêmicos em comparação aos indivíduos normais, devido à necessidade da presença destas enzimas para regenerar a GSH. Porém, mesmo essas taxas são consideradas insuficientes para regenerar a quantidade necessária de GSH para as células. A G6-PD regenera GSH através da geração de NADPH, importante para a manutenção da integridade de certas proteínas nos eritrócitos maduros. Isso pode ser explicado pelas necessidades aumentadas dos eritrócitos talassêmicos em manter a integridade celular, uma vez que apresentam tendência à exacerbação do processo oxidativo (CHAKRABORTY & BHATTACHARYYA, 2001).

Nos experimentos de TAVAZZI et al. (2001), quantificou-se a concentração de ferro livre ligado à membrana eritrocitária em portadores de  $\beta$ -talassemia intermediária, com valores médios de 51,03 nmoles/mg de proteína, sem detecção do mesmo em eritrócitos de indivíduos normais. Os autores concluíram que o ferro ligado à membrana é a causa do estresse oxidativo nos eritrócitos e que, o uso terapêutico dos quelantes de ferro, permeáveis aos lipídios e antioxidantes, pode reduzir o estresse oxidativo e amenizar a anemia em talassêmicos.

KASSAB-CHEKIR et al. (2003) comprovaram a atividade elevada das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase, em crianças portadoras de  $\beta$ -talassemia maior. O índice de estado oxidativo, medido através de TBARS, foi considerado alto em comparação ao controle, indicando a lipoperoxidação pelos radicais de oxigênio. As enzimas citadas são consideradas como antioxidantes por efetuarem a remoção dos metabólitos tóxicos do oxigênio. Quando suas atividades estão elevadas no sangue, indicam oxidação elevada e presença de espécies reativas do oxigênio. O aumento da SOD reflete a ação requerida contra o radical superóxido ( $O_2^-$ ), produzido pelo peróxido de hidrogênio nos eritrócitos; o aumento da glutathione peroxidase indica a detoxificação do radical hidroxila. Mesmo com atividades elevadas, as enzimas antioxidantes ainda podem ser consideradas insuficientes para conter as espécies reativas do oxigênio, se a concentração de TBARS for elevada.

Nos experimentos de EYBL et al. (2002), as atividades enzimáticas de glutathione peroxidase e de catalase em homogeneizado de fígado de camundongos não foram afetadas pelo excesso de ferro. No tratamento das amostras com os quelantes de ferro, no entanto, a glutathione peroxidase foi reduzida em presença de DFX e L1, enquanto a catalase teve aumento significativo após tratamento com L1, em comparação ao controle.

CHAKRABORTY & BHATTACHARYYA (2001) comprovaram que a baixa atividade de GSH é um indício do estado pró-oxidante, enquanto a diminuição da atividade de catalase favorece a lipoperoxidação mediada pelo peróxido de hidrogênio em eritrócitos de  $\beta$ -talassêmicos e E $\beta$ -talassêmicos. Também concluíram que a L1 reduz a concentração de ferro ligado à membrana e a produção de malonilaldeído a partir do estresse por peróxido de hidrogênio. A GSH é um “coletor” importante dos radicais livres e potente antioxidante endógeno que protege a célula da injúria oxidativa. A GSH se encontra reduzida nestes pacientes em comparação



ao controle, sugerindo que os eritrócitos se encontram em uma condição pró-oxidante, principal causa do aumento da hemólise e diminuição da sobrevivência dos eritrócitos. Neste trabalho, encontrou-se concentrações de GSH próximas ao normal para os  $\beta$ -talassêmicos menor e valores até maiores que o normal em  $\beta$ -talassêmicos maior. Uma possível explicação seria a de que todos os pacientes portadores de  $\beta$ -talassemia maior estudados recebem transfusões de eritrócitos regularmente, em geral a cada 30 dias, além da terapia com DFX e ou L1.

ATTAMA & GINSBURG (1995) verificaram, em suspensões de eritrócitos com hematócrito de 5%, um papel eficiente da DFX na quelatação do ferro proveniente da degradação da hemoglobina, com atividades das enzimas da via hexose monofosfato diminuídas em 77% em comparação ao controle. Quando o ferro é liberado da hemoglobina, o peróxido de hidrogênio produzido durante o redox cíclico ativa a produção das enzimas da via hexose monofosfato.

KORKINA et al. (2000) estudaram eritrócitos de pacientes de  $\beta$ -talassemia maior, dependentes da transfusão sanguínea e tratados com DFX e L1; e de  $\beta$ -talassemia intermediária, não dependentes de transfusão e não tratados com quelantes. Observaram, sob estresse oxidativo, a diminuição de antioxidantes, como coenzima Q e  $\alpha$ -tocoferol; o aumento das atividades de SOD e GSH peroxidase; e a depleção de GSH. As atividades enzimáticas de SOD e GSH peroxidase foram elevadas nos pacientes que utilizavam DFX e L1; e as de catalase e glutathione-S-transferase, diminuídas nos pacientes tratados com L1. Concluíram que a L1 protege eficientemente  $\alpha$ -tocoferol, coenzima Q e GSH contra a oxidação, a qual é acompanhada por um aumento de conteúdo dos ácidos graxos poliinsaturados na membrana celular; e que a L1, diferentemente de DFX, desvia o equilíbrio entre os radicais superóxido e hidroxila, em favor do superóxido, como um eficiente antioxidante intracelular.

#### **6.4 Análise comparativa entre os resultados obtidos para os Grupos A, B e C**

A tabela 2 ilustra o estudo comparativo entre os resultados obtidos para os grupos estudados. Observou-se que os eritrócitos de indivíduos portadores de  $\beta$ -talassemia menor (B) e os pacientes de  $\beta$ -talassemia maior (A) apresentaram, de forma espontânea, em eritrócitos não lavados, cerca de 5% de corpos de Heinz e

0,26% de hemólise; e 10% de corpos de Heinz e 0,54% de hemólise, respectivamente. Não houve formação de corpos de Heinz ou hemólise no sangue de indivíduos normais do Grupo C, em amostras nas quais os eritrócitos não haviam sido lavados ou tratados com qualquer reagente. Estes dados estão de acordo com os valores citados na literatura para formação de corpos de Heinz e hemólise em talassêmicos (LEE et al., 1999; NAOUM et al., 2006)

O tratamento dos eritrócitos com 3 mmol/L de TBHP levou:

- i) à formação de metahemoglobina, com níveis médios de 20% no grupo C; 26% no grupo B; e 26,5% no grupo A;
- ii) à diminuição dos níveis de GSH para 2,8 e 3,5  $\mu$ mol/L (A1 e A2, respectivamente) e à sua depleção (B e C);
- iii) à formação de corpos de Heinz, com valores de 9% (C), 34% (B), 43% (A1) e 51% (A2);
- iv) a índices de hemólise de 0,65% (C), 3,7% (B), 6,4% (A1) e 5,6% (A2).

A oxidação com 5 mmol/L de TBHP ocasionou a diminuição das atividades enzimáticas de G6-PD para 84% dos valores iniciais (C), 34,7% (B), 34,1% (A1) e 26,5% (A2) e não provocou alterações nas atividades de GR.

No contexto geral, observa-se que, se a formação de metHb corresponde à oxidação imediata da hemoglobina diante de um estresse oxidativo, nos indivíduos portadores de  $\beta$ -talassemia menor, os valores aumentados em relação ao controle podem ser devidos à presença de ferro livre na membrana eritrocitária, que contribui para a formação de radicais livres. Embora isto ocorra de forma mais acentuada nos pacientes de  $\beta$ -talassemia maior, a formação de metHb não diferiu em relação ao grupo anterior, sugerindo um efeito protetor dos quelantes administrados aos mesmos, não havendo diferenças para os sub-grupos tratados com DFX ou com DFX e L1.

Em relação aos valores obtidos para GSH, da mesma forma, embora se tenha encontrado depleção pelo tratamento com TBHP nos Grupos B e C; no Grupo A houve proteção parcial contra a oxidação da molécula de GSH, possivelmente pelo uso terapêutico dos dois quelantes.

Por outro lado, a formação de corpos de Heinz e a hemólise foram mais acentuadas nos grupos A e B, particularmente nos pacientes de  $\beta$ -talassemia maior. Apesar da proteção conferida pelos quelantes de ferro, a oxidação é exacerbada tanto na forma leve quanto na grave da doença, como demonstrado pela presença

de produtos finais da oxidação, como os corpos de Heinz, e pela hemólise. Nesse aspecto, pode-se inferir que a proteção contra a oxidação conferida pelos quelantes de ferro não é total.

As atividades de G6-PD diminuíram em todos os grupos após o tratamento com TBHP, porém, a diminuição foi muito mais acentuada nos indivíduos portadores de  $\beta$ -talassemias. É curioso observar as atividades aumentadas de G6-PD em eritrócitos de portadores de  $\beta$ -talassemia menor em relação aos grupos A e C. Esses pacientes parecem desenvolver uma maior capacidade de regenerar a molécula de GSH no sentido de guardar maior reserva de proteção contra a oxidação (CHAKRABORTY & BHATTACHARYYA, 2001). No entanto, sob estresse oxidativo, seus eritrócitos têm suas atividades de G6-PD diminuídas drasticamente, tanto quanto os eritrócitos de  $\beta$ -talassêmicos maior, chegando aos níveis normais de atividade enzimática, enquanto eritrócitos normais apresentam pouca diminuição de atividade de G6-PD.

O emprego de 4 mmoles/l de DFX na presença de 3 mmoles/l de TBHP:

- i) diminuiu a formação de metHb a 3% (C) e a 19%(B);
- ii) protegeu a GSH da depleção total, com valores de 3,18  $\mu$ moles/l (C) e 1,34  $\mu$ moles/l (B);
- iii) preveniu a formação de corpos de Heinz;
- iv) não protegeu contra a hemólise (C); e,

Também não houve proteção de G6-PD contra a oxidação ocasionada por 5 mmoles/l de TBHP (C), por incubação prévia com 1, 2 ou 4 mmoles/l de DFX.

Tais resultados comprovam a ação protetora da DFX em experimentos *in vitro*, apesar desta proteção não ser observada em relação à hemólise e nem à atividade de G6-PD.

O emprego de 12 mmoles/l de L1 na presença de 3 mmoles/l de TBHP não protegeu contra a formação de metHb (B e C), ou de corpos de Heinz (C), preveniu a depleção de GSH, com valores de cerca de 3  $\mu$ moles/L (B e C); não protegeu contra a hemólise e não protegeu a G6-PD contra a oxidação (5 mmoles/l de TBHP) (C).

A L1 só se mostrou eficiente na proteção contra a depleção de GSH, mas não interferiu no processo oxidativo em relação aos outros metabólitos testados. Considerando-se o fato de que são necessárias 3 moléculas de deferiprona para quelar uma molécula de Fe (BERNHARDT, 2007), testou-se este quelante em concentrações ainda maiores, de até 24 mmoles/l, porém mesmo assim, não houve

qualquer diminuição da formação de metHb. Existem relatos na literatura de que a presença de L1 remove uma fração significativa do ferro livre da membrana eritrocitária em  $\beta$ -talassêmicos, minimizando a suscetibilidade ao dano induzido pela oxidação (CHAKRABORTY & BHATTACHARYYA, 2001).

O emprego conjunto de 4 mmoles/l de DFX e de 12 mmoles/l de L1 na presença de 3 mmoles/l de TBHP, no sentido de avaliar um possível efeito sinérgico entre os dois quelantes de ferro contra a ação do TBHP, levou a um melhor efeito em relação à oxidação de GSH, com valores de 3,4 a 4,8  $\mu$ moles/g Hb (C), porém não foi observada diminuição na formação de metahemoglobina.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, através das análises dos parâmetros oxidativos, pode-se concluir que os eritrócitos de  $\beta$ -talassêmicos menor e maior apresentam elevada atividade oxidativa e que o tratamento com DFX e L1 garante proteção parcial contra a oxidação. O estresse oxidativo promovido por TBHP em eritrócitos normais e de portadores de  $\beta$ -talassemia menor e maior permite esclarecer algumas questões, tendo como exemplo a prevenção da depleção total de GSH por TBHP nas amostras analisadas, sobre o efeito de quelantes de ferro, como DFX e L1, em reações oxidativas em eritrócitos.

Resumindo, os eritrócitos de  $\beta$ -talassêmicos menor e maior apresentaram elevada atividade oxidativa, sendo que os  $\beta$ -talassêmicos menor tinham elevadas atividades de G6-PD; o tratamento de pacientes portadores de  $\beta$ -talassemia maior com DFX e L1 garantiu uma proteção parcial contra a oxidação. O estresse oxidativo promovido por TBHP em eritrócitos normais e de portadores de  $\beta$ -talassemia menor e maior permitiu esclarecer algumas questões sobre o efeito de quelantes de ferro em reações oxidativas em eritrócitos, tais como: a DFX protegeu a hemoglobina e, parcialmente, a GSH, contra a oxidação, e inibiu a formação de corpos de Heinz, enquanto a L1 apenas protegeu parcialmente a oxidação de GSH.

A partir dos resultados obtidos, pode-se sugerir a importância de se aprofundar as pesquisas para maior esclarecimento a respeito do metabolismo oxidativo de eritrócitos de portadores de  $\beta$ -talassemias, envolvendo especialmente os quelantes de ferro empregados terapeuticamente. Adicionalmente, tais pesquisas poderão oferecer novas contribuições para aperfeiçoar os cuidados não só para garantir melhores condições de vida aos  $\beta$ -talassêmicos maior, cujo tratamento tem evoluído sobremaneira nas últimas décadas, mas também para melhorar a qualidade de vida dos  $\beta$ -talassêmicos menor, cuja patologia tende a ser minimizada por apresentarem, em geral, poucos e leves sinais e sintomas detectáveis.

## 7. CONCLUSÃO:

O estudo da ação dos quelantes de ferro, desferoxamina (DFX) e deferiprona (L1), em eritrócitos de indivíduos normais (C) e de portadores de  $\beta$ -talassemia maior tratados com DFX e L1 (A1) e DFX (A2) e menor (B), submetidos à oxidação por *tert*-butilhidroperóxido (TBHP), permitiu concluir que:

a) Os eritrócitos de indivíduos portadores de  $\beta$ -talassemia (A e B) apresentaram alguns efeitos espontâneos de oxidação, com a presença de corpos de Heinz e de hemólise.

b) A oxidação com TBHP levou a:

- formação de metahemoglobina, em níveis mais elevados nos grupos A e B;
- diminuição dos níveis de GSH (A), e sua depleção (B e C);
- formação de corpos de Heinz e hemólise, em maiores valores em A e B
- diminuição das atividades enzimáticas de G6-PD, mais acentuada em A e B;
- atividades de GR inalteradas.

d) O emprego de DFX na presença de TBHP:

- diminuiu a formação de metHb (C) e (B);
- protegeu a GSH da depleção total (C) e (B),
- preveniu a formação de corpos de Heinz (C);
- não protegeu contra a hemólise (C)
- não protegeu a G6-PD contra a oxidação (C).

f) O emprego de L1 na presença de TBHP:

- não protegeu contra a formação de metHb (B e C),
- não protegeu contra a formação de corpos de Heinz (C);
- preveniu a depleção total de GSH (B e C);
- não protegeu contra a hemólise (C);
- não protegeu a G6-PD contra a oxidação (C).

h) o tratamento conjunto com DFX e L1, na presença de TBHP:

- teve melhor efeito contra a ação do TBHP na oxidação de GSH;
- não levou a efeito sinérgico na inibição de formação de metahemoglobina.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se sugerir que os eritrócitos de  $\beta$ -talassêmicos menor e maior apresentam elevada atividade oxidativa e que o tratamento com DFX e L1 garante proteção parcial contra a oxidação. O estresse oxidativo promovido por TBHP em eritrócitos normais e de portadores de  $\beta$ -talassemia menor e maior permite esclarecer algumas questões sobre o efeito de quelantes de ferro, como DFX e L1, em reações oxidativas em eritrócitos.

## 8. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B., et al., **Fundamentos de Biologia Celular**. Porto Alegre: Artmed, 1999. 80p.

ATAMNA, H.; GINSBURG, H. Heme degradation in the presence of glutathione. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, n. 42, p. 24876 – 24883, 1995.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, P. D. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113 – 123, 2006.

BERNHARDT, P.V. Coordination chemistry and biology of chelators for the treatment of iron overload disorders. **Dalton Transactions**, Cambridge, v.30, p. 3214-3220, 2007.

BEUTLER, E.; DERN, R. J.; ALVING, A. S. The hemolytic effect of primaquine. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, New York, v. 45, p. 40-45, 1955.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of good glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, New York, v. 61, p. 882-890, 1963.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. 3. ed. Orlando : Grune & Stratton, 1984. 188p.

BEUTLER, E.; HOFFBRAND, A. V.; COOK, J. Iron Deficiency and Overload. **American Society of Hematology**, Washington, p. 40-61, 2003.

BREUER, W.; ERMERS, M. J. J.; POOTRAKUL, P.; ABRAMOV, A.; HERSHKO, C.; CABANTCHIK, Z. I. Desferrioxamine-chelatable iron, a component of serum non-transferrin-bound iron, used for assessing chelation therapy. **Blood**, Washington, v. 97, n. 3, p. 792 – 798, 2001.

CAZZOLA, M.; DESTRFANO, P.; PONCHIO, L.; LOCATELLI, F.; BEGUIN, Y.; DESSI, C.; BARELLA, S.; CAO, A.; GALANELLO, R. Relationship between transfusion regimen and suppression of erythropoiesis in thalassaemia major. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 89, p. 473 – 478, 1995.

CECI, A.; BALARDI, P.; FELISI, M. et al. The safety and effectiveness of deferiprone in a large-scale, 3-year study in Italian patients. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 118, p. 330-336, 2002.

CHAN, A.; CHOW, C.; CHIU, D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 222, p. 274-282, 1999.



CHAKRABORTY, D.; BHATTACHARYYA, M. Antioxidant defense status of red blood cells of patients with  $\beta$ -thalassemia and E $\beta$ -thalassemia. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam: v. 305, p. 123 – 129, 2001.

CHAVES, M. A. F. **Ação antioxidante das vitaminas C e E no processo oxidativo em eritrócitos de indivíduos portadores de hemoglobina S**. Curitiba, 2007. Dissertação (Mestrado – Área de Análises Clínicas) – Setor de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Paraná.

CLARO, L. M.; ALBERTON, K.; LEONART, M. S. S. Formação de corpos de Heinz em eritrócitos de pacientes portadores de anemias hemolíticas. **Revista do XXV Congresso Brasileiro de Análises Clínicas**, Porto Alegre: v. 30, p. 93, 1998.

CLARO, L. M.; LEONART, M. S. S.; NASCIMENTO, A. J. Effect of vitamins C and E on oxidative process in human erythrocytes. **Cell Biochemistry and Function**, Guildford: v. 24, p. 531 – 535, 2006.

COHEN, A. R.; GALANELLO, R.; PENNELL, D. J.; CUNNINGHAM, M. J.; VICHINSKY, E. Thalassemia. **American Society of Hematology**, Washington: p. 14 – 34, 2004.

COMAR, S. R. **Ação de quercetina, rutina e extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera* em eritrócitos humanos submetidos a sobrecarga oxidativa**. Curitiba, 2003. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná.

CRISPONI, G.; NURCHI, V. M.; SILVAGNI, R. ; FAA, G. Oral iron chelators for clinical use. **Polyhedron**, Oxford, v. 18, p. 3219-3226, 1999.

DACIE, J.; LEWIS, S.M. **Practical Haematology**. 10 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995. 722p.

DEVLIN, T. M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. 5 ed. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 2003, p. 837 – 856.

DOMANSKI, A. V.; LAPSHINA, E. A.; ZAVODNIK, I. B. Oxidative process induced by *tert*-butyl hydroperoxide in human red blood cells: chemiluminescence studies. **Biochemistry**, Moscow, v. 70, n. 7, p. 922 – 932, 2005.

DUNN, L. L.; RAHMANTO, Y. S.; RICHARDSON, D. R. Iron uptake and metabolism in the new millennium. **Trends in Cell Biology**, Cambridge: v. 17, n. 2, p. 93-100, 2006.

EMERIT, J.; BEAUMONT, C.; TRIVIN, F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris: v. 55, p. 333-339, 2001.

EVELYN, K. A.; MALLOY, H. T. Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfehemoglobin in single sample of blood. **The Journal of Biology Chemical**, Baltimore: v. 126, p. 655 – 662, 1938.

EYBL, V.; KOTYZOVÁ, D.; KOLEK, M.; KOUTENSKÝ, J.; NIELSEN, P. The influence of deferiprone (L1) and deferoxamine on iron and essential element tissue level and parameters of oxidative status in dietary iron-loaded mice. **Toxicology Letters**: Amsterdam: v. 128, p. 169 – 175, 2002.

FAA, G.; CRISPONI, G. Iron chelating agents in clinical practice. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 184, p- 291 – 310, 1999.

FABRON, A.; TRICTA, F. Terapia quelante oral com deferiprona em pacientes com sobrecarga de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro: v. 25, n. 3, p. 177 – 188, 2003.

FERRALI, M.; SIGNORINI, C.; CICCOLI, L.; COMPORTI, M. 1992 Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and isouramil. **Biochemical Journal**, Siena, v. 285, p. 295 – 301, 1992.

FREI, B. Molecular and biological mechanism of antioxidant action. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, Bethesda, v. 13, p. 963 - 964, 1999.

GABUTTI, V., PIGA, A. Results of Long-Term Iron-Chelating Therapy. **Acta Haematologica**, Basel, v. 95, p. 26 – 36, 1996.

GALANELLO, R. Thalassemia. New Iron Chelators. **American Society of Hematology**, Cagliari, p. 17-34, 2004.

GUTTERIDGE, J. M. C.; ROWLEY, D. A.; HALLIWELL, B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radical and lipid peroxidation in the presence of iron salt: detection of catalytic iron and anti-oxidant activity in extracellular fluids. **Biochemical Journal**, London: v. 206, p. 605 – 609, 1982.

HALLIDAY, J.W.; RAMM, G. A.; POWELL, L. W. Cellular iron processing and storage: the role of ferritin. In: BROCK, J. H.; HALLIDAY, J. W.; PIPPARD, M. J.; POWELL, L. W. Eds. Iron metabolism in health and disease. London: **W. B. Saunders**, p. 97 – 121, 1994.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3rd Edition. Oxford University Press, New York, 1999.

HAMERSCHLACK, N. **Protocolo de Tratamento: Diretrizes para o Controle Clínico da Talassemia**. Federação Internacional de Talassemia (TIF). Disponível no site: Disponível no site: [www.abrasta.org.br](http://www.abrasta.org.br) (acessado dia 17/01/2008).

HANDIN, R. I.; LUX, S. E.; STOSSEL, T. P. **Blood: Principles and Practice of Hematology**. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, p. 76-174, 1995.

HARRIS, J. R. **Blood Cell Biochemistry**, New York: Plenum Press, 1991.

HIGGS, D. R.; WEATHERALL, D. J. The haemoglobinopathies. **Clinical Hematology**, London, v. 6, n.1, p. 117 – 150, 1993.

HOFFBRAND, A. V. Deferiprone therapy for transfusional iron overload. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, London: v.18, n. 2, p. 299 – 317, 2005.

HOFFBRAND, A. V.; COHEN, A.; HERSHKO, C. Role of deferiprona in chelation therapy for transfusional iron overload. **Blood**, London, v. 102, p. 17 – 24, 2003.

HOGMAN, C. F.; HEDLUND, K.; SAHLESTROM, Y. Red cell preservation in protein poor media. III. Protection against *in vitro* hemolysis. **Vox Sanguinis**, Basel: v. 42, p. 274 – 281, 1981.

JANDL, J. H. **Blood: Textbook of Hematology**. 2 ed. Boston, Brown and Company, p. 505 – 506, 1996.

KASSAB-CHEKIR, A.; LARADI, S.; FERCHICHI, S. et al. Oxidant, antioxidant status and metabolic data in patients with beta-thalassemia. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 338, p. 79 – 86, 2003.

KATTAMIS, A.; LADIS, V.; BERDOUSI, H.; KELEKIS, N. L.; ALEXOPOLOU, E.; PAPASOTIRIOU, I.; DRAKAKI, K.; KALOUMENOU, I.; GALANI, A.; KATTAMIS, C. Iron chelation treatment with combined therapy with deferiprone and deferioxamine: A 12 month-trial. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, Athens: v. 36, p. 21-25, 2006.

KORKINA, L.; LUCA, C. D.; DEEVA, I.; PERROTTA, S.; NOBILI, B.; PASSI, S.; PUDDU, P. L1 effects on reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS) release, hemoglobin oxidation, low molecular weight antioxidants, and antioxidant enzymes activities in red and white blood cells of thalassemic patients. **Transfusion Science**, Bloxham, v. 23, p. 253 – 254, 2000.

KRUKOSKI, D.W. **Ação antioxidante de ácido L-ascórbico e desferoxamina em eritrócitos humanos isolados submetidos a sobrecarga oxidativa por *terc*-butilhidroperóxido**. Curitiba. 2006. 75p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná.

LEE, R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J.; RODGERS, G. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, p. 196 – 217, 1999.

LACHANT, N.; TANAKA, K. Antioxidants in sickle cell disease: the *in vitro* effects of acid ascorbic. **The American Journal of the Medical Sciences**, New York, v. 292, n. 1, p. 3 -10, 1986.

LINK, G., KONKIN A. M., BREUER, W.; CABANTCHIK, Z. I.; HERSHKO, C.; Exploring the “iron shuttle” hypothesis in chelation therapy: effects of combined desferoxamina and deferiprona treatment in hypertransfused rats with labeled iron stores and in iron-loaded rat hearts cells in culture. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Jerusalem, v. 138, p. 130-138, 2001.

LIU, D. Y.; LIU, Z. D.; HIDER, R. C. Oral iron chelators – development and application. **Best Practice & Research**, London: v. 15, p. 369 – 384, 2002.

LUKENS, J. N. The thalassemias and related disorders: quantitative disorders of hemoglobin synthesis. **Wintrobe's Clinical Hematology**, Baltimore: v. 1, p. 1405-1448, 1999.

MOORE, R. B.; BAMBERG, A. D.; WILSON, L. C.; JENKINS, L. D.; MANKAD, V. N. Ascorbate protects against *tert*-butyl hydroperoxide inhibition of erythrocyte membrane  $\text{Ca}^{2+}$  +  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York: v. 278, p. 416 – 424, 1989.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997, 171p.

NAOUM, P. C.; QUERINO, S. S. S.; CURY, N. M.; TOLEDO, C. G.; NAOUM, F. A. Avaliação laboratorial da toxicidade molecular em eritrócitos talassêmicos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**: Rio de Janeiro: v. 28, p. 301 – 302, 2006.

NELSON, S. K.; Mc CORD, J. M. Iron, oxygen radicals, and disease. **Advances in Molecular and Cell Biology**, New York, v. 25, p. 157 – 183, 1998.

NIIHARA, Y.; SHALEV, O.; HEBBEL, R. P.; WU, H.; TU, A.; AKIYAMA, D. S.; TANAKA, K. R. Desferrioxamine (DFO) Conjugated With Starch Decreases NAD Redox Potential of Intact Red Blood Cells (RBC): Evidence for DFO as an Extracellular Inducer of Oxidant Stress in RBC. **American Journal of Hematology**, New York: v. 65, p. 281 – 284, 2000.

OLIVIERI, N. F. Medical progress: the beta-thalassemias. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 341, p. 99-109, 1999.

PAPANIKOLAOU, G.; PANTOPOULOS, K. Iron metabolism and toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York: v. 202, p. 199 – 211, 2005.

PELISSARI, C. B.; STINGHEN, S. T.; NASCIMENTO, A. J.; LEONART, M. S. S. Padronização para a dosagem de hemoglobina extracelular pelo método da cianometehemoglobina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro: v. 24, p. 14 – 16, 1993.

PIGA, A.; GAGLIOTTI, C.; FOGLIACCO, E.; TRICIA, F. Comparative effects of deferiprone and deferoxamine on survival and cardiac disease in patients with thalassemia major: a retrospective analysis. **Transfusion Iron Overload**, Turin: v. 88, p. 489 – 496, 2003.

PONKA, P.; BEAUMONT, C.; RICHARDSON, D. R. Function and regulation of transferrin and ferritin. **Seminars in Hematology**, Philadelphia: v. 35, p. 35 – 54, 1998.

PUNTAROLO, S. Iron, oxidative stress and human health. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford: v. 26, p. 299-312, 2005.

REVUELTA, L.A., et al., Increase in vulnerability to oxidative damage in cholesterol-modified erythrocytes exposed to *t*-BuOOH. **Biochimica et Biophysica Acta**, Salamanca: v. 1734, p. 74 – 85, 2005.

RICE-EVANS, C. A.; *t*-butyl hydroperoxide-induced perturbations of human erythrocytes as a model for oxidant stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam: v. 815, p. 426-462, 1985.

RICE-EVANS, C.; BAYSAL, E.; SINGH, S.; JONES, S. A.; JONES, J. G. The interactions of desferrioxamine and hydroxypyridone compounds with haemoglobin and erythrocytes. **FEBS**, Oxford: v. 256 n. 1,2, p. 17 – 20, 1989.

SCHAFER, A.I.; RABINOWE, S.; LE BOFF, M. S.; BRIDGES, K. CHERON, R. G.; DLUHY, R. Long term efficacy of deferoxamine iron chelation therapy in adults with acquired transfusional iron. **Archive of Internal Medicine**, London: v. 147, n. 7, p. 1217 – 1221, 1985.

SCOTT, M. D.; LUBIN, B. H.; ZUO, L.; KUYPERS, F. A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, New York: v. 118, p. 7 – 16, 1991.

SIMMONS, A. **Hematology**. 2 ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1997. 507p.

SPROGOE-JAKOBSEN, U.; SAETRE, A. M.; GEORGSSEN, J. Preparation of white cell-reduced red cells by filtration: comparison of a bedside filter and two blood bank filter systems. **Transfusion**, Odense, v. 35, p. 421 – 426, 1995.

STRYER, L. **Biochemistry**. 4 ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995, p. 131 – 135.

SUZUKI, T., MUNEHIRO, Y.; KYODEN, Y., CHEON, K. H. Failure of glutathione in suppressing *tert*-butyl hydroperoxide-induced hemolysis *in vitro* of selenium-deficient rat erythrocytes. **Nutrition Research**, Kyoto: v. 8, p. 767-775, 1988.

TAVAZZI, B., et al., Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 267, p. 684-689, 2000.

TELEN, M. J.; KAUFMAN, R. The Mature Erythrocyte. **Wintrobe's Clinical Hematology**, Baltimore: v. 1, p. 193-227, 1999.

VANNUCCHI, H. Effect of different dietary levels of vitamin E on lipid peroxidation in rats. **Archivos latinoamericanos de Nutricion**, Caracas: v. 47, p. 34-37, 1997.

WEATHERALL, D. J.; CLEG, J. B. **The thalassemias syndromes**. 3 ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1981. 875p.

WEINBERG, E. D. Cellular iron metabolism in health and disease. **Drug Metabolism Review**, Bloomington: v. 22, p. 531-579, 1990.

WINTERBOURN, C. C. Oxidative desnaturation in congenital hemolytic anemias: the unstable hemoglobins. **Seminars in Hematology**, New York, v. 27, n. 1, p. 41-50, 1990.

WONKE, B.; WRIGHT, C.; HOFFBRAND, A. V. Combined therapy with deferiprone and desferrioxamine. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 103, p. 361 – 364, 1998.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. B.; PASQUINI, R. **Hematologia Fundamentos e Prática. Ed. Revisão e Atualizada**. Sao Paulo: Ed. Atheneu, 2004, 1090p.

